

Efeito da dietilnitrosamina, associada ou não a fenobarbital e diazepam, sobre fígado de gerbil (*Meriones unguiculatus*)

ROMILDA E. KUHN¹, M. ANGÉLICA GUZMÁN-SILVA², JORGE S. P. GUIMARÃES³

Trabalho extraído da Tese de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental, CCS, UFF.

Resumo

Foram estudadas as alterações hepáticas induzidas quimicamente em gerbil, através de tratamento crônico com dietilnitrosamina subcutânea, associada ou não a fenobarbital oral e diazepam intraperitoneal. As observações foram realizadas a partir da 25ª semana, quando o tratamento foi suspenso, até a 50ª semana. A dietilnitrosamina exerceu efeito hematotóxico acentuado, evidenciado por citomegalia, necrose multifocal, proliferação ductular e fibrose. Este diminuiu intensamente com a administração simultânea de fenobarbital, mas o mesmo não aconteceu com a administração concomitante de diazepam. O tratamento concomitante de fenobarbital não anulou a ação carcinogênica da dietilnitrosamina, e a partir da 36ª semana ocorreram hepatocarcinomas, predominando o padrão trabecular; já o diazepam parece ter diminuído o efeito hepatocarcinógeno e na 50ª semana registraram-se apenas lesões pré-neoplásicas.

Unitermos: dietilnitrosamina; fenobarbital; diazepam; gerbil; hepatotoxicidade; hepatocarcinogênese

Introdução

O efeito carcinogênico da dietilnitrosamina (DENA), um composto N-nitroso, tem sido descrito em ratos [1-8], camundongos [2, 9-20], cobaias [2, 10, 21], hamster [2, 8, 22, 23] e gerbil [24, 25]. Atualmente sabe-se que a DENA requer ativação metabólica para poder exercer seus efeitos tóxicos e carcinogênicos [26-29]. A metabolização se dá pelo sistema enzimático de oxidases microssomais de função mista [27, 29], dependente de citocromo P-450 [28].

O efeito organotrópico da DENA depende, parcialmente, da via ou local de administração; contudo, parece haver uma estreita relação entre a metabolização nos diversos órgãos-alvo, gerando radicais alquilantes - íon carbônio - e o efeito tóxico ou carcinogênico das nitrosaminas [8, 27, 28, 30, 31]. O órgão-alvo afetado mais freqüentemente é o fígado [1-22, 24, 25, 30]. Estudos da carcinogênese hepática,

com nitrosaminas em roedores, têm demonstrado a ocorrência de subpopulações hepatocelulares, que apresentam, em estágios precoces, alterações enzimáticas características [32-39], além de hiperbasofilia citoplasmática [17, 33, 37, 40]. Essas populações focais com expressão fenotípica aberrante teriam caráter pré-neoplásico [17, 32-34, 37, 40].

O fenobarbital (FB), uma droga amplamente utilizada na terapia humana, é um conhecido indutor enzimático [41, 42] e pode modificar o metabolismo de várias substâncias químicas, incluindo as carcinogênicas [41]. Estudos desta droga, quando administrada simultaneamente ao carcinógeno, têm fornecido resultados conflitantes na carcinogênese hepática em ratos [5, 43-45], porém quando administrada posteriormente, tanto em ratos como em camundongos, acelera o processo tumorigênico, ou seja, tem efeito promotor [5-7, 19, 20, 43-57].

Dentre os diversos benzodiazepínicos, o diaze-

¹Professor Titular, AFE; ²Professor Assistente, UFF; ³Professor Titular, UFF - Endereço do autor para correspondência: Universidade Federal Fluminense - Hospital Universitário Antonio Pedro - Departamento de Patologia - Rua Marquês de Paraná, 303 - Niterói - RJ - CEP 24030.

pam (DZ) é a droga prescrita com maior freqüência. Apesar da droga ter entrado na terapêutica há mais de vinte anos, ainda não foi exaustivamente estudado o seu efeito na carcinogênese, o que se faz necessário considerando que o DZ é um derivado fenil de um composto heterocíclico, semelhante ao FB. Em camundongos foi demonstrado que o DZ tem um efeito similar ao FB na hepatocarcinogênese, isto é, exerce efeito indutor das enzimas microsossomais e do citocromo P-450, e age como promotor tumoral [58]. Já em ratos, o DZ inibe algumas enzimas oxidativas da fração microsossomal [59] e não tem o efeito promotor da hepatocarcinogênese [60].

O gerbil é um pequeno roedor, de fácil manejo, adaptado como animal de laboratório e suscetível ao efeito hepatocarcinogênico de DENA [24, 25]. Nesse estudo, avaliamos a resposta do gerbil ao hepatotóxico e cancerígeno DENA, e a influência do FB e do DZ como eventuais modificadores da indução de alterações hepáticas.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados 78 gerbis machos, com quatro a seis semanas de idade, provenientes do biotério do Departamento de Patologia, da Universidade Federal Fluminense. Durante o período de experimentação, os gerbis, separados por grupos de tratamento, receberam ração comercial para cobaias do Moinho São Cristóvão Ltda. *ad libitum* e foram pesados no início do experimento e, a seguir, semanalmente até o término do tratamento. No biotério foi mantido um esquema de iluminação cíclica artificial de doze horas/dia. A temperatura era controlada durante o dia me-

diante ar refrigerado, mantendo-a em torno de 20°C, à noite o biotério permanecia à temperatura ambiente, que variava, aproximadamente, entre 15 e 30°C.

Substâncias químicas

Foram utilizadas DENA da Sigma Chemical Company, FB e DZ da Central de Medicamentos (CEME) e solução injetável de cloreto de sódio a 0,9% do Laboratório Universitário Rodolfo Albino da UFF.

Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para formar quatro grupos experimentais (I, II, III, IV) e quatro grupos-controle (V, VI, VII, VIII), administrando-se os diversos tratamentos, durante 25 semanas, conforme mostra a Tabela 1. O tratamento, assim como o sacrifício de todos os animais, foi realizado entre 14:00 e 16:00 horas. Na ocasião da pesagem semanal, fazia-se uma observação individual detalhada de todos os animais, registrando-se as alterações eventualmente apresentadas. Os animais foram sacrificados mediante sobredose de éter, em duas etapas, ao completar 25 semanas de tratamento e 25 semanas após a suspensão deste. Os animais encontrados em estado agônico também foram sacrificados e estudados, bem como os que morreram durante o experimento e que ainda não apresentavam autólise acentuada.

Técnicas

Os animais foram submetidos a necropsia completa e avaliação macroscópica de todos os órgãos. Para fins de estudo histológico, o fígado e outros órgãos que apresentavam alterações foram fixados em

Tabela 1. Tratamento dos gerbis em cada grupo de estudo.

Grupo	Número de animais	Substâncias químicas	Via de administração	Freqüência
I	16	DENA	Subcutânea	1 x semana
II	16	DENA	Subcutânea	1 x semana
		FB	Oral	Contínuo
III	16	DENA	Subcutânea	1 x semana
		DZ	Intraperitoneal	2 x semana
IV	16	DENA	Subcutânea	1 x semana
		FB	Oral	Contínuo
		DZ	Intraperitoneal	2 x semana
V	4	FB	Oral	Contínuo
VI	4	DZ	Intraperitoneal	2 x semana
VII	4	FB	Oral	Contínuo
		DZ	Intraperitoneal	2 x semana
VIII	2	NaCl	Intraperitoneal	2 x semana

formol 10%, sendo a seguir clivados e processados para inclusão em parafina. Em cortes de 4 mm foram efetuadas as seguintes técnicas de coloração: hematoxilina-eosina, tricrômico de Gomory, reticulina de Gomory, azul de toluidina pH 2,5 e, quando necessário, Sudan III e reação de PAS.

Resultados

Avaliação do estado geral

Foram observados sinais de debilidade física em alguns animais, principalmente dos Grupos I e III, que apresentavam prostração, perda de peso, pêlo arrepiado e quebradiço e, por vezes, dispnéia. A distribuição, entre os grupos, dos animais que foram encontrados mortos e dos sacrificados fora das etapas preestabelecidas, está representada na Tabela 2.

Alterações macroscópicas

Grupo I - 17^a à 25^a semana (n = 5)

As alterações mais comuns traduziam-se por superfície hepática irregular, com pontilhado esbranquiçado difuso e pequenos nódulos brancos esparsos. O parênquima apresentava-se ora congesto, ora pálido e/ou amarelado.

Grupo II - 17^a à 25^a semana (n = 4)

Verificou-se, exclusivamente, acentuado aumento do volume hepático.

36^a à 50^a semana (n = 9)

A superfície hepática exibia pontilhado esbranquiçado e nódulos brancos, geralmente múltiplos, medindo de 0,1 a 2 cm. Um caso exibia dois nódulos esbranquiçados, medindo 0,8 e 2 cm de diâmetro, o menor localizado no hilo e o maior invadindo o pâncreas. O parênquima, em dois casos, mostrava-se congesto.

Grupo III - 18^a à 25^a semana (n = 4)

As alterações macroscópicas eram semelhantes às que ocorriam no fígado dos animais do Grupo I, porém sem exhibir nódulos.

41^a à 50^a semana (n = 3)

A superfície hepática irregular exibia pontilhado esbranquiçado, nódulos brancos esparsos, medindo até 0,2 cm, e áreas deprimidas avermelhadas.

Grupo IV - 17^a à 25^a semana (n = 6)

Verificou-se, exclusivamente, aumento do volume hepático.

50^a semana (n = 6)

A macroscopia foi caracterizada por múltiplos nódulos brancos de diâmetros variados, o maior deles com 1 cm. Dois animais apresentavam superfície hepática finamente granular e múltiplos cistos, medindo até 0,3 cm.

Nos animais dos grupos-controle V, VI, VII, VIII não foi detectada nenhuma alteração macroscópica nas duas etapas de sacrifício. O peso dos respectivos fígados encontra-se especificado na Tabela 3.

Tabela 2. Mortalidade e sacrifícios em cada grupo de estudo.

Grupo	Primeira etapa			Segunda etapa		
	Número de animais	Mortos entre a 17 ^a e 24 ^a semanas	Sacrificados às 25 ^a semanas	Número de animais	Mortos entre a 36 ^a e 48 ^a semanas	Sacrificados às 50 ^a semanas
I	16	12*	4	0	0	0
II	16	2*	5	9	3***	6
III	16	8**	2	6	5**	1
IV	16	5*	5	6	0	6
V	4	0	2	2	0	2
VI	4	0	2	2	0	2
VII	4	0	2	2	1	1
VIII	2	0	1	1	0	1

*Um gerbil estudado

**Dois gerbis estudados

***Três gerbis estudados

Tabela 3. Peso do fígado (g).

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI	GVII	GVIII
A1	1,5	5,8	1,25	3,95	2,7	2,1	3,0	2,6
A2	3,2	2,9	*	2,8	3,5	2,3	3,9	2,35
A3	2,6	4,0	*	2,5	3,0	2,9	3,3	
A4	2,5	3,4	2,7	2,7	2,4	2,6		
A5	3,1	3,8	3,0	2,45				
A6		3,0	2,55	2,8				
A7		*	2,8	*				
A8		4,65		2,9				
A9		2,7		4,2				
A10		4,6		4,0				
A11		6,5		2,8				
A12		3,2		3,85				
A13		4,4						
A14		4,4						
A15		4,1						

*Em face da autólise parcial, não foi pesado.

Histopatologia

Grupo I - 17^a à 25^a semana (n = 5)

Grupo II - 18^a à 25^a semana (n = 4)

O estudo histopatológico do fígado mostrou arquiteturas lobular e trabecular intensamente alteradas. Notou-se proliferação ductular compacta ou formando cistos, inclusive multiloculares, por vezes contendo material PAS positivo. Nas áreas de proliferação ductular compacta, as células geralmente eram ovais. A fibrose associada à proliferação ductular - colangiofibrose (Figura 1) - variava de leve a moderada. A proliferação ductular delimitava ínsulas de hepatócitos que exibiam intensa citomegalia (Figura 2), além de necrose, tendo de permeio ninhos de macrófagos contendo pigmento acastanhado, PAS positivo. Os hepatócitos citomegálicos mostravam-se intensamente hipertrofiados, exibiam citoplasma ora finamente vacuolizado, ora eosinofílico, por vezes contendo pigmento granular acastanhado, PAS positivo. Os núcleos centrais eram volumosos, com cromatina finamente granular e nucléolo central proeminente, geralmente único; a presença de pseudo-inclusão nuclear eosinofílica era freqüente. Havia focos e áreas de células claras, sendo mais freqüentes no Grupo I. As áreas de células claras eram constituídas de hepatócitos aumentados em tamanho, com citoplasma de aspecto vazio e núcleos de aspecto e tamanho normais. Apenas dois casos do Grupo I apresentaram focos de células basofílicas, cujos hepatócitos eram menores e exibiam, quando corados com azul de toluidina, coloração hiperbasofílica; os núcleos eram centrais, de tamanho ligeiramente aumentado, com nucléolo central (Tabela 4).

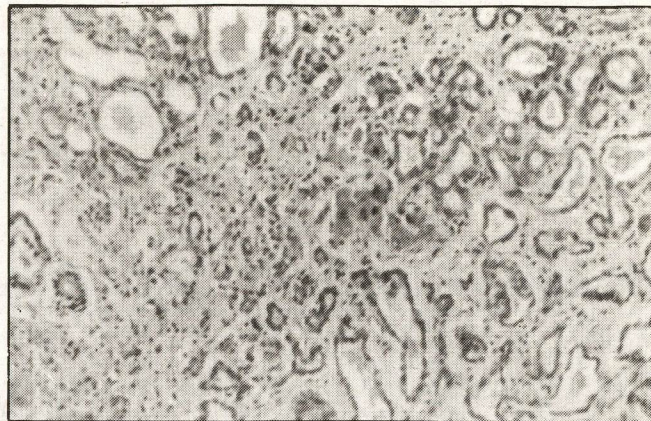


Figura 1 - Grupo III A2 - 24^a semana - Fígado exibindo área de proliferação ductular e fibrose (colangiofibrose). Tricrômico de Gomori 400 x.

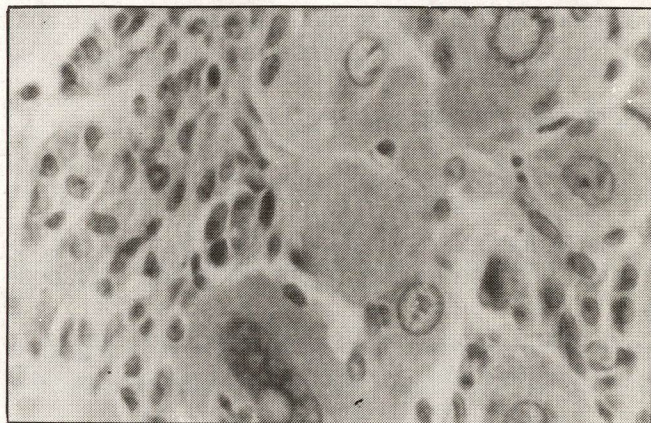


Figura 2 - Grupo I A1 - 17^a semana - Hepatócitos citomegálicos de permeio à proliferação de células ductulares. HE 1.600 x.

Grupo II - 17^a à 25^a semana (n = 6)

Grupo IV - 17^a à 25^a semana (n = 6)

O tecido hepático mostrava discreta distorção da arquitetura lobular e trabecular devida a necrose multifocal e proliferação ductular. Havia de permeio macrófagos com pigmento acastanhado, PAS-positivo e, às vezes, infiltrado inflamatório misto ou de mononucleares. Algumas áreas de proliferação ductular eram compactas, constituídas por células ovais. A fibrose associada a essas alterações, quando presente, era leve. Os hepatócitos exibiam volume aumentado, bem como núcleo volumoso e nucléolo proeminente, ambos de localização central. Havia focos e áreas de células claras, eosinofílicas e basofílicas (Figura 3), sendo estas últimas as mais freqüentes. Apenas um caso do Grupo II exibia, também, nódulos hiperplásicos com características tintórias basofílica e mista (células claras e basofílicas). As características citoplasmáticas das células claras, eosinofílicas e basofílicas correspondiam às descritas anteriormente (Tabela 4).

Tabela 4. Lesões hepáticas induzidas em gerbis, registradas entre a 17ª e a 25ª semanas.

Grupo	Proliferação ductular	Fibrose	Focos e áreas/população hepatocelular				Nódulos/população hepatocelular			
			Clara	Eosinofílica	Basofílica	Mista	Clara	Eosinofílica	Basofílica	Mista
I										
A1	+++	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	++	+	++	-	+	-	-	-	-	-
A3	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-
A4	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-
A5	++	+/-	++	-	+	-	-	-	-	-
II										
A1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A2	+/-	-	+	+	++	-	-	-	+	+
A3	+/-	+/-	+	++	++	-	-	-	-	-
A4	+/-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-
A6	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
III										
A1	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
A3	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
A4	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IV										
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	+/-	+/-	+	-	++	-	-	-	-	-
A3	+/-	+/-	-	-	++	-	-	-	-	-
A4	+/-	+/-	-	+	++	-	-	-	-	-
A5	+/-	+/-	-	+	++	-	-	-	-	-
A6	+/-	+/-	-	+	++	-	-	-	-	-

- Ausente
 + Leve
 ++ Moderada
 +++ Acentuada
 +/- Muito discreta

I DENA
 II DENA + FB
 III DENA + DZ
 IV DENA + FB + DZ

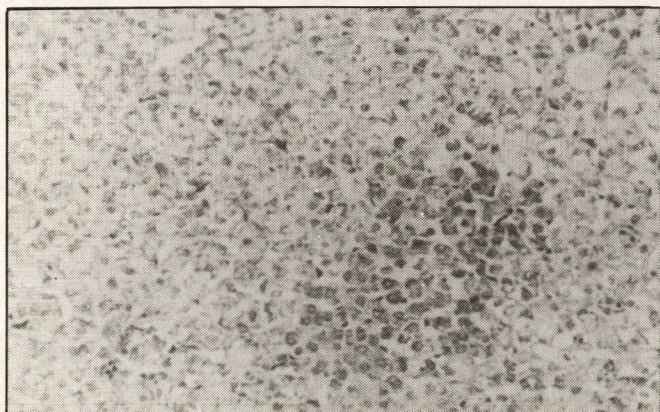


Figura 3. Grupo II A5 - 25ª semana - Fígado apresentando foco de células basofílicas. Azul de toluidina 400 x.

Grupo II - 36ª a 50ª semana (n = 9)

Grupo IV - 50ª semana (n = 6)

O tecido hepático mostrava distorção leve a moderada das arquiteturas lobular e trabecular. Havia

focos esparsos de esteatose, necrose e proliferação ductular, ora compacta, ora cística e multilocular, tendo de permeio macrófagos com pigmento acastanhado, PAS positivo, infiltrado mononuclear ocasional e fibrose leve. Os hepatócitos exibiam volume aumentado, bem como núcleo volumoso e nucléolo proeminente, ambos de localização central. No Grupo II foram observadas áreas de células eosinofílicas e basofílicas, assim como nódulos hiperplásicos com essas características tintoriais (Figura 4). A maioria dos nódulos basofílicos mostrava população heterogênea com clones mais hiperbasofílicos que outros. A organização dos hepatócitos nos nódulos hiperplásicos mais volumosos era feita em lâminas duplas. No Grupo IV foram observadas áreas de células claras, eosinofílicas e basofílicas, assim como nódulos hiperplásicos com as mesmas características tintoriais e outros com população mista de células claras e eosinofílicas (Tabela 5).

Em todos os casos havia nódulos neoplásicos hepáticos, únicos ou múltiplos, e um caso mostrava

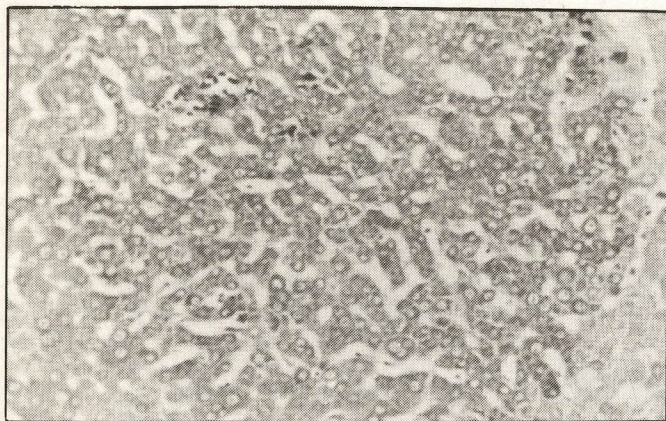


Figura 4 - Grupo II A8 - 48ª semana - Fígado apresentando nódulo hiperplásico basofílico. Azul de toluidina 400 x.

invasão de pâncreas, omento e duodeno, bem como dos linfonodos do hilo hepático. O grau de diferenciação variava de pouco a bem diferenciado. Conforme o aspecto celular predominante e/ou arranjo das células, os hepatocarcinomas foram classificados em trabecular, de células claras, sólido, de células fusiformes e pleomórfico. O padrão adenomatoso só ocorria em áreas dessas neoplasias, sem chegar a ser o

padrão predominante. Nessas áreas, os hepatócitos neoplásicos cubóides constituíam estrutura de aspecto pseudoglandular tubular (Tabela 6).

Hepatocarcinoma trabecular (Figura 5): foi a forma mais freqüente. As células neoplásicas, semelhantes aos hepatócitos, formavam trabéculas de duas ou mais camadas de espessura. Esses cordões celulares se alternavam com canais vasculares semelhantes a sinusóides. Os hepatócitos neoplásicos apresentavam basofilia citoplasmática quando corados com azul de toluidina; a relação núcleo-citoplasma estava aumentada e os nucléolos eram proeminentes. As figuras de mitose eram muito freqüentes em cinco destes nódulos, três do Grupo II e dois do Grupo IV, sendo que algumas eram atípicas. Dos 16 hepatocarcinomas trabeculares, quatro do Grupo II e seis do Grupo IV eram delimitados por cápsula fibrosa, às vezes incompleta; cinco destes nódulos, um do Grupo II e quatro do Grupo IV, exibiam reação inflamatória circunjacente, predominantemente mononuclear. O estroma de todos os nódulos era delicado; quatro casos do Grupo II exibiam áreas de necrose, e três nódulos do Grupo IV apresentavam-se completamente necrosados.

Tabela 5. Lesões hepáticas induzidas em gerbis, registradas entre a 36ª e a 50ª semanas.

Grupo	Proliferação ductular	Fibrose	Focos e áreas/população hepatocelular				Nódulos/população hepatocelular			
			Clara	Eosinofílica	Basofílica	Mista	Clara	Eosinofílica	Basofílica	Mista
II										
A7	-	+/-	-	+	-	-	-	+	-	-
A8	++	+/-	-	+	++	-	-	++	++	-
A9	++	+/-	-	++	++	-	-	+	+	-
A10	+	+/-	-	++	++	-	-	++	++	-
A11	+	-	-	++	++	-	-	++	+	-
A12	+/-	-	-	++	++	-	-	+	+	-
A13	+	-	-	+	+	-	-	++	+	-
A14	+	-	-	+	++	-	-	++	+	-
A15	+	+/-	-	-	++	-	-	++	++	-
III										
A5	++	+/-	-	++	++	-	+	-	+	-
A6	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-
A7	++	+	-	++	+	-	-	+	+	+
IV										
A7	++	++	-	-	++	-	-	+	-	-
A8	++	+/-	+	++	++	-	-	+	-	-
A9	+	+	+	++	++	-	-	-	+	+
A10	+	+	+	++	++	-	-	++	++	-
A11	++	+	+	++	++	-	+	+++	+++	++
A12	++	+	-	++	++	-	-	++	++	++

- Ausente
+/- Muito discreta
+ Leve
++ Moderada
+++ Acentuada

II DENA + FB
III DENA + DZ
IV DENA + FB + DZ

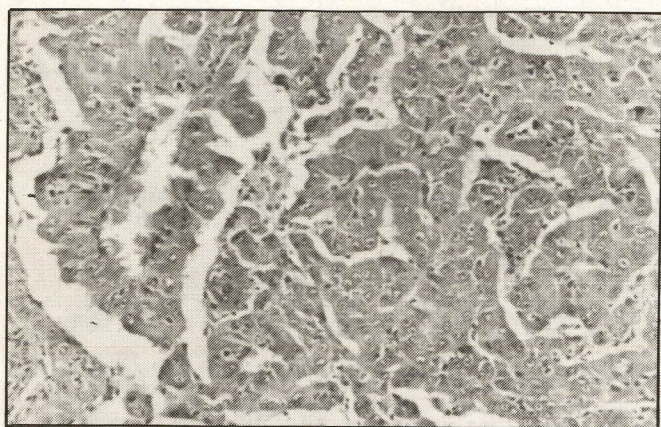


Figura 5 - Grupo II A8 - 48ª semana - Hepatocarcinoma trabecular. HE 400 x.

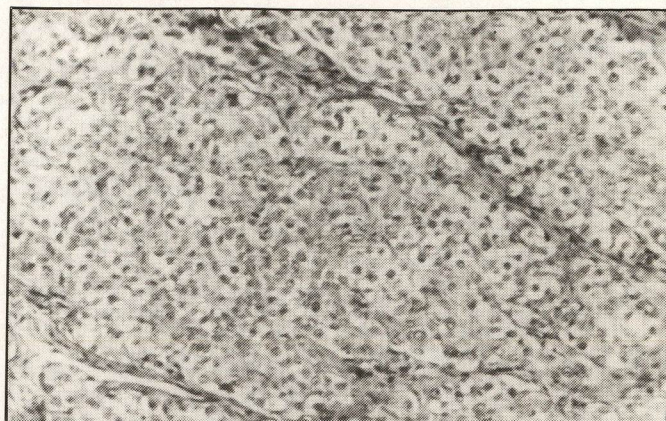


Figura 6 - Grupo II A8 - 48ª semana - Hepatocarcinoma de células claras. HE 400 x.

Hepatocarcinoma de células claras (Figura 6): apenas um animal do Grupo II exibiu nódulo neoplásico não encapsulado constituído por ninhos de células claras volumosas, poliédricas, com citoplasma de aspecto vazio, os quais eram delimitados por estroma bem desenvolvido. Havia áreas de necrose. Os hepatócitos neoplásicos exibiam relação núcleo-citoplasma ligeiramente aumentada e nucléolo proeminente. As figuras de mitose eram muito freqüentes.

Hepatocarcinoma sólido (Figura 7): esse tipo de tumor, presente em dois casos do Grupo II e em três animais do grupo IV, exibiu padrão celular uniforme; os hepatócitos neoplásicos, quando corados com azul

de toluidina, mostravam-se basofílicos. A relação núcleo-citoplasma estava aumentada e os nucléolos eram proeminentes. Todos esses nódulos apresentavam mitoses, cuja freqüência era baixa, moderada ou alta e com formas atípicas. O arranjo das células era compacto e o estroma, delicado, exceto em um caso. Alguns desses nódulos exibiam necrose e cápsula fibrosa pouco desenvolvida.

Hepatocarcinoma de células fusiformes (Figura 8): um animal do Grupo II apresentava, entre outros nódulos neoplásicos, um constituído por células que exibiam pleomorfismo, predominando as formas alongadas. A relação núcleo-citoplasma estava au-

Tabela 6. Hepatocarcinomas induzidos em gerbis, registrados entre a 36ª e a 50ª semanas.

Grupo	Padrão histológico					
	Trabecular	Células claras	Sólido	Fusiforme	Pleomórfico	Misto
II						
A7			1			
A8	1	1				
A9			1			
A10	1					
A11	2			1		
A12	1					
A13	2					
A14					1	1
A15	1					
IV						
A7	5					
A8	1		1			
A9	1					
A10						1
A11			1			
A12	1		2			

II DENA + FB

IV DENA + FB + DZ

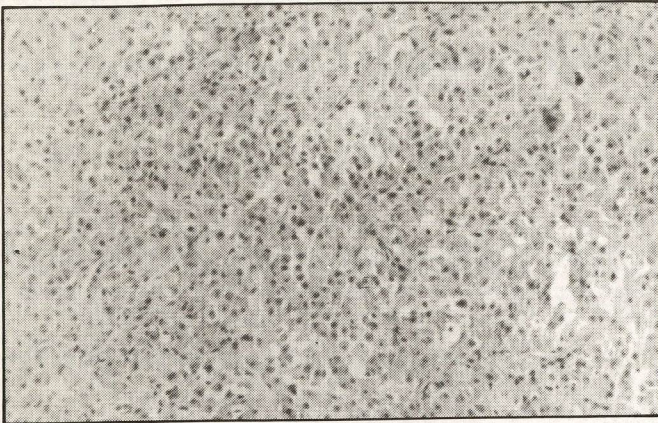


Figura 7 - Grupo II A7 - 36ª semana - Hepatocarcinoma sólido. HE 400 x.



Figura 8 - Grupo II A11 - 50ª semana - Hepatocarcinoma de células fusiformes. HE 400 x.

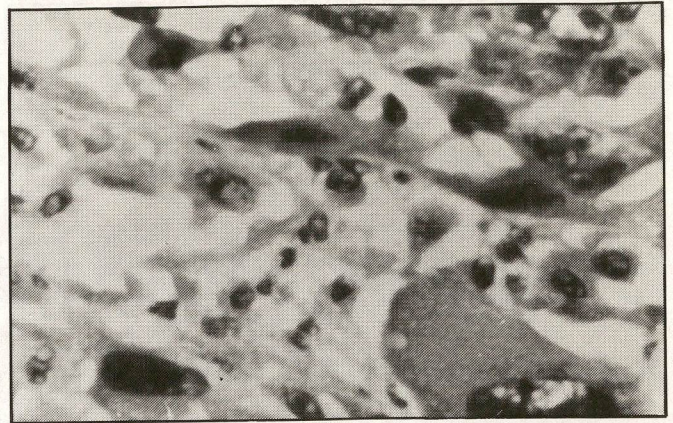


Figura 9 - Grupo II A14 - 50ª semana - Hepatocarcinoma pleomórfico. HE 1.600 x.

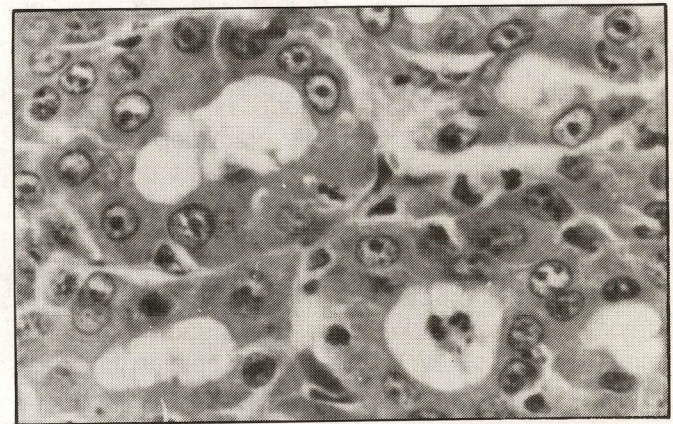


Figura 10 - Grupo II A14 - 50ª semana - Área adenomatosa em hepatocarcinoma misto. HE 1.600 x.

mentada e os nucléolos eram proeminentes. As figuras de mitose eram muito freqüentes e geralmente atípicas. O estroma era mixomatoso e havia extensa necrose central. Este nódulo era delimitado por reação inflamatória mononuclear.

Hepatocarcinoma pleomórfico (Figura 9): as células neoplásicas exibiam acentuado pleomorfismo, inclusive formas gigantes, bi ou multinucleadas. Os núcleos eram intensamente hiper cromáticos, com nucléolos proeminentes, únicos ou múltiplos. As mitoses eram pouco freqüentes. O estroma era mixomatoso e havia extensa necrose central. Esse nódulo, presente em um animal do Grupo II, era delimitado por reação inflamatória mononuclear.

Hepatocarcinoma misto: dois animais exibiam nódulos neoplásicos encapsulados, cuja população celular era organizada ora em trabéculas, ora em formações pseudo-glandulares (Figura 10) ou em áreas sólidas. As figuras de mitose eram muito freqüentes, com raras formas atípicas. Em um desses nódulos neoplásicos do Grupo II o estroma era delicado, enquanto que no outro do Grupo IV era bem desenvolvido.

Grupo III - 41ª a 50ª semana (n = 3)

O estudo histológico do fígado mostrou distorção das arquiteturas lobular e trabecular, que em um caso era intensa. A distorção devia-se à presença de focos esparsos de esteatose, necrose e proliferação ductular cística, inclusive multilocular, por vezes contendo material PAS positivo. Nas áreas de proliferação ductular havia, de permeio, macrófagos com pigmento acastanhado, PAS positivo e fibrose leve. Os hepatócitos exibiam volume aumentado, bem como núcleo volumoso, com cromatina finamente granular e nucléolo proeminente, ambos de localização central. Havia, ainda, raros hepatócitos citomegálicos isolados. Foram observadas áreas de células raras, eosinofílicas e basofílicas, bem como nódulos hiperplásicos com as mesmas características tintoriais, sendo um deles misto (células claras e eosinofílicas) (Tabela 5).

Grupos V (n = 2), VI (n = 2), VII (n = 2) e VIII (n = 1) - 25ª semana

Grupos V (n = 2), VI (n = 2), VII (n = 1) e VIII (n = 1) - 50ª semana

Além dos animais dos grupos-controle, descritos na metodologia, foi estudado o fígado de nove gerbis machos, provenientes da mesma colônia e com idade comparável à dos animais tratados, correspondendo dois ao primeiro período de observação e sete ao último. O tecido hepático de todos os gerbis dos grupos-controle, bem como dos testemunhas, não apresentou qualquer alteração histopatológica, exceto pelo aumento de volume dos hepatócitos nos animais que receberam FB.

Discussão

Verificamos que os gerbis tratados apenas com DENA (Grupo I) não sobreviveram além da 25ª semana. As alterações do parênquima hepático consistiam em proliferação ductular, intensa citomegalia, além de necrose multifocal, sendo resultado do efeito citotóxico da DENA, como descrito por Farber [33]. Acreditamos que a alta mortalidade neste grupo seja devida diretamente ao efeito citotóxico do carcinógeno, uma vez que os gerbis que receberam tratamento combinado, principalmente aquele associado ao FB, sobreviveram até a última etapa de observação. O FB comprovadamente induz as enzimas oxidativas hepáticas [38, 41, 42, 58, 59, 61], diminuindo o efeito citotóxico da DENA, ao passo que, em relação ao DZ, o efeito indutor enzimático só é descrito em camundongos [58]. Além das alterações citotóxicas, foram observados focos e áreas de células claras e de células basofílicas, lesões estas que exprimem alterações fenotípicas reconhecidas como um estágio precoce da carcinogênese hepática [17, 32-34, 37, 40, 62, 63].

Os animais que receberam DENA associada ao DZ (Grupo III), até a 25ª semana, exibiam também lesões decorrentes da hepatotoxicidade, inclusive com fibrose acentuada, e apenas um caso apresentou focos de células claras. Entre a 41ª e a 50ª semana, as alterações conseqüentes ao efeito citotóxico eram menos evidentes, e prevaleciam focos e nódulos fenotipicamente alterados, lesões essas descritas como estágios evolutivos da hepatocarcinogênese [17, 33, 34, 37, 62-65]. O DZ administrado concomitantemente parece não diminuir o efeito hepatotóxico da DENA no gerbil, porém aumentou a sobrevida dos animais, uma vez que vários gerbis suportaram o tratamento e mais tarde foram registradas lesões pré-neoplásicas. A ausência de hepatocarcinoma nestes animais pode dever-se à dose total de DENA ter sido inferior à utilizada por Green e Ketkar [25], uma vez que o tratamento foi suspenso na 25ª semana, enquanto que esses autores administraram a DENA durante toda a vida dos animais. O DZ aparentemente não anula, mas parece diminuir o efeito carcinógeno da DENA, e esta ação pode ser conseqüência do efeito inibidor enzimático do DZ, como descrito em fígado de ratos

[59]. Green e Ketkar [25] relatam que o DZ, quando administrado concomitante a DENA, no gerbil, bloqueia mais de 50% de sua atividade hepatocarcinogênica.

Os animais que receberam DENA associada ao FB (Grupo II) e os tratados com DENA, FB e DZ (Grupo IV) apresentaram resultados semelhantes entre si. Até a 25ª semana, as alterações histopatológicas hepáticas decorrentes do efeito citotóxico da DENA, como proliferação ductular, necrose multifocal e fibrose, eram muito discretas, quando não ausentes, e os hepatócitos apresentavam-se hipertrofiados. O FB, sendo um indutor enzimático e, portanto, acelerando a metabolização da DENA, diminuiu de maneira acentuada as alterações histopatológicas que caracterizam o efeito citotóxico do carcinógeno. Nessa primeira etapa de observação, havia vários focos e áreas de hepatócitos fenotipicamente alterados, predominando os constituídos de células basofílicas. Esses resultados, quando comparados com os grupos experimentais que não receberam FB (Grupos I e III), indicam um aumento considerável desses focos e áreas citologicamente semelhantes dos elementos celulares dos nódulos hiperplásicos, estágio este que pode evoluir para hepatocarcinoma [17, 33, 34, 37, 62-65]. Não há dados com relação ao uso da DENA associada ao FB no gerbil, mas comprovamos que, até a suspensão do tratamento, o fígado dessa espécie respondeu de maneira semelhante à observada em ratos, no que se refere à indução de lesões pré-neoplásicas [5].

Conseqüentemente ao efeito protetor do FB sobre a hepatotoxicidade da DENA, todos os animais sobreviveram às 25 semanas de tratamento e, a partir da 36ª semana, começaram a surgir tumores hepáticos. Os gerbis do Grupo II (DENA e FB) exibiram um total de 14 hepatocarcinomas, que foram classificados como oito trabeculares, dois sólidos, um de células claras, um de células fusiformes, um pleomórfico e um misto. Já os gerbis do Grupo IV (DENA, FB e DZ) apresentaram um total de 13 hepatocarcinomas, entre os quais oito eram trabeculares, quatro sólidos e um misto. Em ambos os grupos ocorreu um predomínio de hepatocarcinomas de padrão trabecular, demonstrando que o gerbil responde de maneira similar ao rato, no que se refere ao tipo histológico de tumor induzido com maior freqüência [6, 36].

Na última etapa de observação, os animais tratados com DENA e FB (Grupo II), bem como os que receberam DENA, FB e DZ (Grupo IV), além dos hepatomas, exibiam alterações histopatológicas devidas à citotoxicidade do carcinógeno, porém eram leves. Quanto às lesões pré-neoplásicas, em ambos os grupos havia a presença simultânea de focos, áreas e nódulos de células claras, e muitos dos nódulos basofílicos apresentavam clones hiperbasofílicos.

Portanto, parece correta a afirmação de que os focos e áreas fenotipicamente alterados e citologicamente semelhantes aos elementos celulares dos nódulos hiperplásicos são alterações preliminares necessárias para a formação de neoplasias benignas, com ocasional progressão para hepatocarcinomas [17, 33, 34, 37, 62-65].

Com base nos resultados morfológicos, referentes à hipertrofia dos hepatócitos, acreditamos que, no gerbil, o FB age realmente como indutor enzimático, de forma similar à descrita em fígado de ratos [38, 42, 58, 59, 61]. Já o DZ poderia ter efeito inibidor de algumas enzimas microssomais, semelhante ao observado em ratos [59]. Contudo, o DZ parece não interferir na ação do FB, tanto no que se refere à indução enzimática quanto ao seu efeito na hepatocarcinogênese, uma vez que os resultados do Grupo II (DENA e FB) e do Grupo IV (DENA, FB e DZ) foram similares e todos os animais desenvolveram hepatocarcinomas, às vezes múltiplos. Por último, consideramos que o gerbil é uma espécie animal adequada para o estudo da carcinogênese hepática.

Summary

Chemically induced hepatic changes were studied in gerbils submitted to a chronic subcutaneous treatment of diethylnitrosamine in association or not with oral phenobarbital administration and diazepam intraperitoneally injected. The treatments were carried out for twenty-five weeks and morphological studies were performed between the 25th and the 50th week. Diethylnitrosamine was a potent hepatotoxic agent causing cytomegalia, multifocal necrosis, ductular proliferation and fibrosis. Such effects were markedly reduced following simultaneous administration of phenobarbital. Moreover, hepatocarcinomas were observed (mainly with a trabecular pattern) on the 36th week. Concomitant treatment of diazepam did not alter the hepatotoxicity but could diminish the hepatocarcinogenic effect of diethylnitrosamine because only preneoplastic lesions were registered at the 50th week.

Key words: *diethylnitrosamine; phenobarbital; diazepam; gerbil; hepatotoxicity; hepatocarcinogenesis*

Recebido em abril/91

Aceito para publicação em junho/91

Referências bibliográficas

- THOMAS C. Zur Morphologie der durch DiäthylNitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. *Z Krebsforsch* 1961; 64: 224-233.
- SCHMÄHL D, OSSWALD H. Carcinogenesis in different animals species by diethylnitrosamine. *Experientia* 1967; 23: 497-498.
- REUBER MD, LEE CW. Effect of age and sex on hepatic lesions in Buffalo strain rats ingesting diethylnitrosamine. *JNCI* 1968; 41: 1133-1140.
- SVOBODA D, HIGGINSON J. A comparison of ultrastructural changes in rat liver due to chemical carcinogens. *Cancer Res* 1968; 28: 1703-1733.
- WEISBURGER JH, MADISON RM, WARD JM, VIGUERA C, WEISBURGER EK. Modification of diethylnitrosamine liver carcinogenesis with phenobarbital but not with immunosuppression. *JNCI* 1975; 54: 1185-1188.
- KITAGAWA T, SUGANO H. Enhancing effect of phenobarbital on the development of enzyme-altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3'-methyl-4-(dimethylamine)azobenzene or diethylnitrosamine. *GANN* 1978; 68: 679-687.
- MOCHIZUKY Y, KURUKAWA K, SAWADA N, GOTOH M. Dose-dependent enhancing effect of phenobarbital on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in the rat. *GANN* 1981; 72: 170-173.
- LIJINSKY W. Species differences in nitrosamine carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 108: 46-55.
- SCHMÄHL D, THOMAS C, KÖNIO K. Versuche zur Krebszeugung mit DiäthylNitrosamin by Mäusen. *Naturwissenschaften* 1963; 50: 407.
- THOMAS C, SCHMÄHL D. The morphology of diethylnitrosamine induced hepatic tumors in the mouse and guinea pig. *Z Krebsforsch* 1963; 65: 531-536.
- KATAYAMA S, OOTA K. Induction of malignant tumors in various strains of mice by oral administration of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine. *GANN* 1965; 56: 189-199.
- GARGUS JL, PAYNTER OE, REESE Jr. WH. Utilization of newborn mice in the bioassay of chemical carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 1969; 15: 552-559.
- CLAPP NK. Carcinogenicity of nitrosamines and methanesulphonate esters given intraperitoneally, in RF mice. *Int J Cancer* 1973; 12: 728-733.
- AKAMATSU Y. Carcinogenicity of N-nitrosodiethylamine (DEN), N-nitrosodi-N-butylamine (DBN), and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNG) in strains of mice: single intragastric treatment of 10 times maximum tolerated dose (MTD). *Proc Am Ass Cancer Res* 1975; 16: 162.
- DIWAN BA, MEIER H. Carcinogenic effects of a single dose of diethylnitrosamine in three unrelated strains of mice: genetic dependence of the induced tumor types and incidence. *Cancer Lett* 1976; 1: 249-253.
- VESELINOVITCH SD. Infant mouse as a sensitive bioassay system for carcinogenicity of N-nitroso compounds. *IARC Sci Publ* 1980; (31): 645-655.
- KUEN H, PUGH TD, GOLDFARB S. Hepatocarcinogenesis in the mouse. Combined morphologic-stereologic studies. *Am J Pathol* 1983; 112: 89-100.
- VESELINOVITCH SD, KOKA M, MIHAILOVICH N, RAO KVN. Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 108: 60-65.
- DIWAN BA, RICE JM, OHSHIMA M, WARD JM. Interstrain differences in susceptibility to liver carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine and its promotion by phenobarbital in C57BL/6Ncr, C3H/HeNcr^{mtv} and DBA/2NCR mice. *Carcinogenesis* 1986; 7: 215-220.
- PEREIRA MA, KLAUNIG JE, HERREN-FREUND SL, RUCH RJ. Effect of phenobarbital on the development of liver tumors in juvenile and adult mice. *JNCI* 1986; 77: 449-452.
- ARGUS MF, HOCH-LIGETI C. Induction of malignant tumors in the guinea pig by oral administration of diethylnitrosamine. *JNCI* 1963; 30: 533-551.
- HERROLD KM, DUNHAM LJ. Induction of tumors in the syrian hamster with diethylnitrosamine (N-nitrosodiethylamine). *Cancer Res* 1963; 23: 773-777.
- MOHR U, ALTHOFF J, AUTHALER A. Diaplacental effect of the carcinogen diethylnitrosamine in the golden hamster. *Cancer Res* 1966; 26: 2349-2352.
- HAAS H, KMOCH N, MOHR U. Susceptibility of gerbils (*Meriones*

- unguiculatus*) to weekly subcutaneous and single intravenous injections of N-diethylnitrosamine. *Z Krebsforsch* 1975; 83: 233-238.
25. GREEN U, KETKAR M. The influence of diazepam and thiouracil upon the carcinogenic effect of diethylnitrosamine in gerbils. *Z Krebsforsch* 1978; 92: 55-62.
 26. HEATH DF. The decomposition and toxicity of dialkyl nitrosamines in rats. *Biochem J* 1962; 85: 72-91.
 27. SELKIRK JK. Chemical carcinogenesis: a brief overview of the mechanism of action of polycyclic hydrocarbons, aromatic amines, nitrosamines, and aflatoxins. In: SLAGA TJ, ed. *Carcinogenesis modifiers of chemical carcinogenesis*. New York: Raven Press 1980: 1-31.
 28. WEISBURGER EK. Metabolism and activation of chemical carcinogens. *Molec Cell Biochem* 1980; 32: 95-104.
 29. BRITTEBBO EB, LÖFBERG B, TJÄLVE H. Sites of metabolism of N-nitrosodiethylamine in mice. *Chem-Biol Interact* 1981; 34: 209-221.
 30. MAGEE PN, LEE KY. Cellular injury and carcinogenesis. Alkylation of ribonucleic acid of rat liver by diethylnitrosamine and n-butylmethyl nitrosamine *in vivo*. *Biochem J* 1964; 91: 35-42.
 31. SWANN PF, MAGEE PN. Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of N-7 of guanine of nucleic acids of the rat by diethylnitrosamine, N-ethyl-N-nitrosourea and ethyl-methanesulphonate. *Biochem J* 1971; 125: 841-847.
 32. RABES H, HARTENSTEIN R, SCHOLZE P. Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Experientia* 1970; 26: 1356-1359.
 33. FARBER E. The pathology of experimental liver cell cancer. In: CAMERON HM, LINSELL DA, WARWICK GP, eds. *Liver Cell Cancer*. Amsterdam: Elsevier 1976: 243-277.
 34. PITOT HC. The natural history of neoplasia. Newer insights into an old problem. *Am J Pathol* 1977; 89: 402-411.
 35. SOLT DB, MEDLINE A, FARBER E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in and new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 1977; 88: 595-618.
 36. OGAWA K, MEDLINE A, FARBER E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerative liver. *Br J Cancer* 1979; 40: 782-790.
 37. WILLIAMS GM. The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochem Biophys Acta* 1980; 605: 167-189.
 38. LEONARD TB, DENT JG, GRAICHEN E, LYGH T O, POPP JA. Comparison of hepatic carcinogen initiation-promotion systems. *Carcinogenesis* 1982; 3: 851-856.
 39. PERAINO C, CARNES BA, STEVENS FJ. Evidence for growth heterogeneity among foci with different phenotypes in the population of altered hepatocyte foci induced by a single neonatal treatment with carcinogen. *Carcinogenesis* 1986; 7: 191-192.
 40. SOLT D, FARBER E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976; 263: 701-703.
 41. HARVY SC. Hipnóticos e sedativos. In: Goodman LS, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1978: 95-114.
 42. SUMNER IG, LODOLA A. Total cytochrome P-450, but not the major phenobarbitone or 3-methylcholanthrene induced isoenzyme, is differentially induced in the lobes of the rat liver. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 391-393.
 43. NARITA T, WATANABE R, KITAGAWA T. Mechanisms of inhibition by simultaneously administered phenobarbital of 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *GANN* 1980; 71: 755-758.
 44. TAPER HS, LANS M, DE GERLACHE J, FORT L, ROBERFROID M. Morphological alterations and ONase deficiency in phenobarbital promotion of N-nitrosomorpholine initiated rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1983; 4: 231-234.
 45. KITAGAWA T, HINO O, NOMURA K, SUGANO H. Dose-response studies on promoting and anticarcinogenic effects of phenobarbital and DDT in the rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1984; 5: 1653-1656.
 46. WATANABE K, WILLIAMS GM. Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by the liver tumor promoter phenobarbital: evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promoter acts on carcinogen-induced lesions. *JNCI* 1978; 61: 1311-1314.
 47. KITAGAWA T, PITOT HC, MILLER EC, MILLER JA. Promotion by dietary phenobarbital of hepatocarcinogenesis by 2-methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene in the rat. *Cancer Res* 1979; 39: 112-115.
 48. NISHIZUMI M. Effect of phenobarbital, dichlorodiphenyltrichloroetha, and polychlorinated biphenyls on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *GANN* 1979; 70: 835-837.
 49. UCHIDA E, HIRONO I. Effect of phenobarbital on induction of liver and lung tumors by dimethylnitrosamine in newborn mice. *GANN* 1979; 70: 639-644.
 50. UCHIDA E, HIRONO I. Effect of phenobarbital on the development of neoplastic lesions in the liver of cycasin-treated rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1981; 100: 231-238.
 51. McLEAN AEM, SMITH M, DRIVER HE. Liver tumors after single dose dimethylnitrosamine, low and high protein diet, and phenobarbitone. *Carcinogenesis* 1982; 3: 701-709.
 52. ISUDA H, FUKUSHIMA S, IMAIDA K, KURATA Y, ITO N. Organ-specific promoting effect of phenobarbital and saccharin in induction of thyroid, liver, and urinary bladder tumors in rats after initiation with N-nitrosomethylurea. *Cancer Res* 1983; 43: 3292-3296.
 53. WARD JM, RICE JM, CREASIA D, LYNCH P, RIGGS C. Dissimilar patterns of promotion by di(2-ethylhexyl)phtalate and phenobarbital of hepatocellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F mice. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1021-1029.
 54. ITO N, MOORE MA, BANNASCH P. Modification of the development of N-nitrosomorpholine-induced hepatic lesions by 2-acetylaminofluorene, phenobarbital and 4,4'-diaminodiphenylmethane: a sequential histological and histochemical analysis. *Carcinogenesis* 1984; 5: 335-342.
 55. WILLIAMS GM, FURUYA K. Distinction between liver neoplasm promoting and syncarcinogenic effects demonstrated by exposure to phenobarbital or diethylnitrosamine either before or after N-2-fluorenylacetamide. *Carcinogenesis* 1984; 5: 171-174.
 56. DIWAN BA, PALMER AE, OHSHIMA M, RICE JM. N-nitroso-N-methylurea initiation in multiple tissues for organ-specific tumor promotion in rats by phenobarbital. *JNCI* 1985; 75: 1099-1105.
 57. DRIVER HE, McLEAN AEM. Dose-response relationship for phenobarbitone promotion of liver tumours initiated by single dose dimethylnitrosamine. *Br J Exp Path* 1986; 67: 131-139.
 58. DIWAN BA, RICE JM, WARD JM. Tumor-promoting activity of benzodiazepine tranquilizers, diazepam and oxazepam, in mouse liver. *Carcinogenesis* 1986; 7: 789-794.
 59. VORNE M, IDANPAAN-HEIKKILA J. Inhibition of drug metabolizing enzymes by diazepam in rat liver. *Experientia* 1975; 31: 962-963.
 60. HINO O, KITAGAWA T. Effect of diazepam on hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol Lett* 1982; 155-157.
 61. KANEKO A, DEMPO K, KAKU T, YOKOYAMA S, SATOH M, MORI M, ONOÉ T. Effect of phenobarbital administration on hepatocytes constituting the hyperplastic nodules induced in rat liver by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1980; 40: 1658-1662.
 62. SELL S, LEFFERT HL. An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1982; 2: 77-86.
 63. BANNASCH P. Sequential cellular changes during chemical carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 108: 11-22.
 64. FARBER E, CAMERON R. The sequential analysis of cancer development. *Adv Cancer Res* 1980; 31: 125-226.
 65. CAMERON R, FARBER E. Some conclusions derived from a liver model for carcinogenesis. *Natl Cancer Inst Monogr* 1981; 58: 49-53.