Modelo experimental de hepatocarcinoma por dietilnitrosamina em ratos

Experimental induction of hepatocellular carcinome by dietilnitrosamine in a rat model

LARISSA WIDHOLZER GALANT – Mestre em Hepatologia pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA); médica Gastroenterologista da ISCMPA.
ANGELO ALVES DE MATTOS – Professor Titular da disciplina de Gastroenterologia e do Curso de Pós-Graduação em Hepatologia da FFFCMPA.
CAROLINE KAERCHER KRAMER – Residente em Clínica Médica pela FFFCMPA – ISCMPA.
EDUARDO MENTI – Residente em Clínica Médica pela FFFCMPA – ISCMPA.
FABIANA BORBA VALIATTI – Residente em Oftalmologia pela ISCMPA.
ANTÔNIO HARTMANN – Professor Adjunto da disciplina de Patologia da FFFCMPA – ISCMPA.
CLÁUDIA RHODEN – Professora Adjunta da disciplina de Farmacologia Básica e Clínica da FFFCMPA. Professora dos Cursos de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia e Ciências Médicas da FFFCMPA.

Curso de Pós-Graduação em Hepatologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre e CNPq, através do programa de bolsas de estudo para graduação e pós-graduação.

✉ Endereço para correspondência:
Larissa Widholzer Galant
Rua Casemiro de Abreu, 917/201
90420-001 – Porto Alegre, RS – Brasil
Fone (51) 3331-0880 / (51) 9969-7017
(51) 3226-9581
lwgalant@terra.com.br

RESUMO

O carcinoma hepatocelular é um dos tumores malignos mais freqüentes do homem, tendo prognóstico muito reservado. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo animal de indução de carcinoma hepatocelular, já que o mesmo poderá trazer respostas na busca de novas perspectivas terapêuticas. No modelo experimental desenvolvido, foram utilizados 15 ratos machos com 45 dias de vida, linhagem Wistar/FFFCMPA. Todos os animais receberam dietilnitrosamina (DEN) através de água, que consumiam diariamente *ad libitum*, por 70 dias consecutivos, seguido por 56 dias de observação. Findo esse período, todos os animais foram sacrificados por decapitação, sendo explorados cirurgicamente e retirados seus fígados inteiros. Resultados: O consumo médio de solução de DEN, por animal, foi de 36±3 ml. Um dos animais foi a óbito antes do término do experimento. Dos 14 animais analisados, 11 deles apresentaram nódulos malignos hepáticos à histologia (78,5%), e nos outros três animais, nódulos benignos foram diagnosticados nos fígados (21,5%). A aplicação de um método de indução experimental de hepatocarcinoma por DEN em nosso estudo mostrou-se exitosa. Esse modelo fornece substrato para a investigação e experimentação de novas modalidades de terapia para o carcinoma hepatocelular.

UNITERMOS: Carcinoma Hepatocelular, Dietilnitrosamina, Tumores de Fígado.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is one of the most frequent malignancies in humans, with a very poor prognosis. The aim of this study was to develop an animal model of induction of hepatocellular carcinoma which could produce answers to the search for new therapeutic perspectives. In the experimental model, 15 fourty-five-day-old male rats of the Wistar/FFFCMPA lineage were used. All the animals received diethylnitrosamine (DEN) through the water, which was daily consumed ad libitum *during 70 days in a row, followed by 56 days of observation. After this period, all the animals were sacrificed by decapitation. They were submitted to surgery and had their livers entirely removed. Results: the average consumption of DEN, per animal, was 36±3mL. One of the animals died during the study. Out of the 14 analyzed animals, 11 showed hepatic malignant nodules on histology (78.5%), while the other 3 animals had benign nodules in their livers (21.5%). The application of a method of experimental induction of hepatocellular carcinoma through the use of DEN in our study was successful. This model provides basis for the investigation and experiment of new techniques of hepatocellular carcinoma therapy.*

KEY-WORDS: *Hepatocellular Carcinoma, Diethylnitrosamine, Hepatic Tumors.*

INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tumores malignos mais freqüentes no homem. O número de casos novos ao ano, no mundo, é estimado entre 500.000 a um milhão, causando, pelo menos, 250 mil mortes no mesmo período. A análise dos dados de sobrevida evidencia o pobre prognóstico desta doença: a média geral em 5 anos não ultrapassa os 6% (1).

O CHC demonstra grande variação na sua incidência, dependendo da área geográfica em questão, do sexo e da idade da população estudada. África do Sul, China, Japão e Coréia apresentam mais de 15 casos/100.000 habitantes ao ano, representando zonas de alta incidência. Já nos países da América Latina, Canadá, Austrália e Alemanha o número de casos novos ao ano é inferior a 5/100.000 habitantes, sendo consideradas regiões de baixa incidência (2). Deve-se salientar que a qualidade dos dados coletados pode variar de uma região para outra, influenciando de maneira significativa a real incidência desta neoplasia no mundo.

A incidência no Brasil é pouco conhecida. Em 1995, em Florianópolis, realizou-se o Fórum Nacional sobre Carcinoma Hepatocelular, onde foram abordados aspectos epidemiológicos

de 287 casos de CHC de oito estados brasileiros. Através dos dados disponibilizados, acredita-se que a incidência seja baixa (3). Já estudos que avaliaram a freqüência de CHC em necropsias (dado indireto da incidência) observaram ser esta maior em estados como Espírito Santo e Bahia (4). Um maior número de casos na Amazônia ainda não foi comprovado (5).

A escolha do melhor tratamento para o CHC depende, basicamente, da extensão do tumor, da concomitância ou não de hepatopatia crônica e cirrose e da severidade da disfunção hepática.

A cirurgia da neoplasia, quando a lesão tem condições de ressecabilidade, é uma escolha adequada, embora a recorrência possa chegar a 50% em três anos (6). Nos pacientes em que há concomitância de hepatopatia crônica, o transplante hepático, em casos selecionados, pode traduzir boa sobrevida (6).

Dentre os métodos não cirúrgicos, os mais utilizados são a injeção percutânea de álcool e a quimioembolização (na tentativa de diminuir o tamanho do tumor para torná-lo ressecável posteriormente). Outro método, como a termoablação, tem sido utilizado (7).

Tendo em vista o impacto causado na saúde de um indivíduo após o surgimento de um CHC, a procura por novos métodos de tratamento, sejam curativos ou paliativos, deve ser estimulada. Neste sentido, torna-se fundamental a criação de modelos animais de indução de CHC, já que os mesmos poderão trazer respostas a esta busca.

A hepatocarcinogênese experimental tem sido estudada há décadas, sendo conhecidos vários agentes oncogênicos, como vírus, radiação e substâncias químicas. Os modelos de indução de tumores de fígado mais citados na literatura recente utilizam um agente carcinógeno químico, denominado dietilnitrosamina (DEN) (8).

A DEN é um agente alquilante do DNA que é rapidamente metabolizado a substâncias reativas que interagem com o DNA, dando origem a células carreadoras de alterações genéticas, as quais monoclonalmente proliferam após inicialização do processo neoplásico. Possui dose letal de 280 mg/kg e boa estabilidade na água. Além de causar dano ao DNA, promovendo a iniciação da carcinogênese hepática, já foi descrito um aumento do índice mitótico hepático com o uso de DEN, o que seria responsável também por um efeito promotor (9).

MATERIAL E MÉTODOS

a) Animais:

Foram utilizados ratos machos, com 45 dias de vida, heterozigotos, com peso aproximado de 200 g cada, da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com dimensões de 47 × 34 × 18 cm, em conjuntos de 4 (quatro) animais por gaiola, sob condições controladas de temperatura (22°C ± 2,0°C) e de luz (ciclo claro das 7 às 19 horas). Os ratos receberam ração padronizada (Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes Ltda.) e água *ad libitum.*

b) Drogas:

Solução de dietilnitrosamina (DEN) 50mg/ml (Sigma-Aldrich, USA) preparada em água (49,8 mg de DEN/litro de água). Em função da fotossensibilidade desta solução, as mamadeiras foram pintadas com tinta preta externamente.

c) Procedimento experimental – indução tumoral:

A indução de hepatocarcinoma envolveu a oferta da solução de DEN na água de beber dos animais por um período de 70 dias consecutivos, conforme se observa na Figura 1. Durante esse período a ingesta hídrica diária destes animais foi quantificada, bem como avaliado o peso corporal dos animais a cada 14 dias. Após 8 semanas do término da indução tumoral, os animais foram decapitados para a remoção do fígado e procedida a análise histopatológica. Inicialmente, o fígado foi colocado em solução de Bouin e, posteriormente, em álcool 70%.

Depois de cortados, os lobos médios dos fígados foram embebidos em parafina, sendo as lâminas coradas pela técnica de hematoxilina-eosina.

Os critérios adotados, na análise microscópica, para diagnóstico de lesões hepáticas benignas ou malignas, seguiram as diretrizes do *Institute of Laboratory Animal Resources Monograph on histological typing of liver tumors of the rat*, descritas por Stewart *et al* (10). As neoplasias primárias hepáticas foram divididas em dois grandes grupos: neoplasias benignas ou neoplasias malignas. Os nódulos benignos caracterizam-se por lesões arredondadas com células acidófilas ou basófilas (células claras) ou ambas. As células variam de tamanho, e seu núcleo pode estar hipercromático e aumentado. Pode haver, ainda, figuras mitóticas anormais. Um achado importante é a demarcação clara da periferia do nódulo, com tecido hepático adjacente normal. Já os nódulos malignos, cujo padrão principal é o trabecular, caracterizam-se por células neoplásicas irregulares e alargadas em diversos graus de alterações citológicas, em geral com mais de duas células por

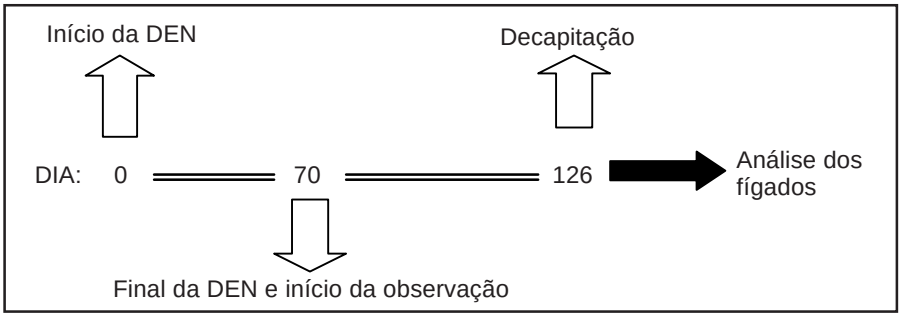


Figura 1 – Representação esquemática do protocolo experimental de indução de hepatocarcinoma, com dietilnitrosamina, em ratos.

trabécula, constituindo macrotrabéculas. Em outros casos os sinusóides estão alargados, dando um aspecto acinar à lesão. Muitas vezes não há uma delimitação clara entre as células neoplásicas e os hepatócitos normais (10, 11).

e) Aspectos éticos:

O protocolo experimental foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FFFCMPA, sob o número de processo 38/00. Todos os ratos foram manipulados observando-se rigorosamente as normas institucionais para trabalhos experimentais com animais preconizadas por esse comitê.

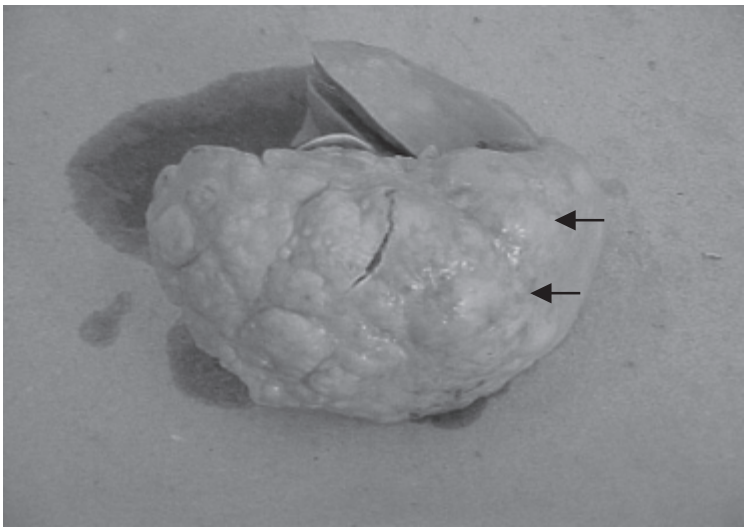


Figura 2 – Aspecto macroscópico de fígado de rato tratado com DEN, evidenciando presença de nódulos mal delimitados em sua maioria.

RESULTADOS

O consumo médio de DEN por rato foi de 36 ± 3ml e o consumo total de 2684 ± 239ml. De um total de 15 animais avaliados, um foi ao óbito no 31º dia do estudo, sendo excluído da análise dos resultados. Desta forma, 14 animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento de neoplasia. O peso médio dos ratos no início do estudo foi de 262 ± 31g. Ao final do estudo, o peso médio dos ratos foi de 390 ± 34g.

Quando avaliado o tamanho médio do maior tumor por fígado examinado, o mesmo foi de 8,1 ± 5,7mm, sendo que o número médio de nódulos por fígado foi de 14 ± 10. Na Figura 2 observa-se importante nodularidade da superfície hepática.

Quando avaliadas as lâminas preparadas a partir do lobo médio, observa-se uma multiplicidade de lesões, sendo que a média de nódulos foi de 1,5 ± 0,34. Na Figura 3, observam-se os achados histológicos de malignidade avaliados a microscopia (coloração hematoxilina & eosina – HE).

Em relação à taxa de indução de carcinoma hepatocelular, verificou-se que 78,5% dos animais tiveram diagnóstico histológico positivo para o mesmo e 21,5% desenvolveram nódulos neoplásicos benignos à avaliação histológica.

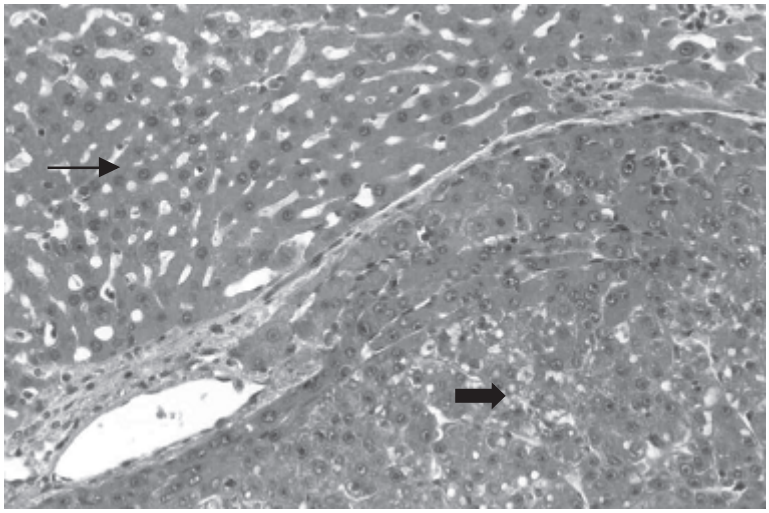


Figura 3 – Achados histológicos no fígado neoplásico (HE 200x).
→ Hepatócitos normais.
➡ Hepatocarcinoma: alteração da relação núcleo-citoplasma, citoplasma acidófilo e presença de macrotrabéculas.

DISCUSSÃO

Trabalhos experimentais permitem a avaliação de novos tratamentos medicamentosos cuja testagem em humanos estaria contra-indicada pela ausência de conhecimento científico suficiente sobre a ação benéfica dos mesmos, ou até mesmo seus efeitos colaterais indesejáveis. Dessa maneira, ao realizar-se um estudo com animais de laboratório, procura-se obter informações que possam ser aplicadas, em uma estância seguinte, no aperfeiçoamento das técnicas de tratamento de doenças em humanos.

Já se observou que a seqüência de alterações morfológicas e moleculares nos hepatócitos, durante a hepatocarcinogênese química experimental em ratos, é semelhante à encontrada na evolução dos tumores de fígado em humanos, descrita detalhadamente por Bannash (12). Assim, a escolha de um

modelo experimental de hepatocarcinogênese em ratos permite considerações com relação à doença hepática também em humanos.

No presente estudo, seguiu-se o modelo experimental de hepatocarcinogênese descrito por Johnson et al (13), considerando-se a concentração de solução de DEN utilizada por peso de rato e o tempo ao qual os animais foram expostos a ela. Salienta-se que, diferentemente de Johnson, os ratos utilizados eram do sexo masculino. O peso inicial dos animais foi aproximadamente 50g maior do que aqueles utilizados pelo mesmo autor.

O grupo de ratos apresentou uma incidência de nódulos malignos hepáticos de 78% após 130 dias de estudo (11 animais em 14), diferentemente do modelo original aplicado por Johnson, em que foi relatada a presença de CHC em aproximadamente 61% dos ratos no mesmo período (11 dos 18 animais testados). Acredita-se que essa diferença encontrada correlaciona-se ao fato de ter sido estudado pequeno número de animais em ambos os trabalhos. Existe também a possibilidade de essa diferença ter ocorrido em virtude de tratar-se de animais de laboratórios distintos (mesmo que da mesma linhagem, Wistar), com diferente "sensibilidade" ao carcinógeno utilizado.

Além desse modelo de indução utilizando DEN por um período contínuo (de inicialização), seguido por um período de observação (promoção), existem outros modelos bastante citados na literatura que utilizam a DEN de forma semelhante ao aqui descrito, porém precedido de hepatectomia parcial. Acredita-se que com o aumento do índice mitogênico que sucede a hepatectomia, o efeito da DEN seja potencializado, o que se traduz em 100% do achado histológico de CHC em alguns trabalhos (14, 15). Salienta-se que, apesar de maior índice de CHC, esse modelo não reflete o processo de hepatocarcinogênese em humanos, uma vez que nesses os eventos agressores são contínuos e não precedidos pela replicação celular hepática, como a obtida após a hepatectomia.

Outros modelos experimentais para CHC foram descritos utilizando agentes carcinógenos menos potentes. Rao et al (16), utilizando dehidroepiandrosterona, observaram nódulos hepáticos neoplásicos em 94% dos animais, porém o índice de CHC foi menor que no modelo de DEN. Também já foi descrito modelo de CHC através de dietas deficientes em colina (17), com resultados também não superiores ao modelo aqui descrito.

Vários dos tratamentos disponíveis para pacientes com CHC encontram barreiras em decorrência da importante perda funcional hepática existente, pois, na maioria dos casos, o doente apresenta cirrose. Além disso, a possibilidade de doença neoplásica multicêntrica não detectada por métodos de imagem diminui substancialmente as chances de resposta a tratamentos como a injeção percutânea de álcool, a termoablação, a quimioembolização, as cirurgias de ressecção e o transplante hepático. A utilização de fármacos com ação sistêmica tem a intenção de contribuir no tratamento de doentes com hepatopatia crônica, evitando que uma lesão com potencialidade de malignização viesse a ter esse tipo de evolução. Poderia, também, agir como coadjuvante a outras formas de tratamento já consagradas. Desta forma, a partir da viabilização de modelos de hepatocarcinogênese animal, poder-se-á avaliar o papel de diversas drogas, tentando assim suplantar as dificuldades existentes no tratamento desta doença que tanto empobrece o prognóstico dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EL-SERAG, HASHEM B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. Clin Liver Dis 2001; 5:87-107.
2. CHEM CJ, YU MW, LIAW YW. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol 1997; 12:S294-S308.
3. GONÇALVES CS, PEREIRA FL, GAYOTTO L.C. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of national survey (Florianópolis, SC, 1995). Rev Inst Med Trop São Paulo 1997; 39:165-170.
4. GONÇALVES CS, PEREIRA FL, GONÇALVES PL. Tumores Primitivos do Fígado. In: Mattos AA, Dantas W (eds.). Compêndio de Hepatologia. Fundação BYK, São Paulo. 2001:735-766.
5. MONTO A, WRIGHT T. The epidemiology and prevention of hepatocellular carcinoma. Semin Oncol 2001; 28:441-449.
6. BRUIX J, SHERMAN M, LLOVET JM ET AL. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the study of the Liver. J Hepatol 2001; 35:421-430.
7. RYDER S. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults. Gut 2003; 52:1-8.
8. FAUSTO N. Mouse Liver Tumorigenesis: Models, Mechanisms, and Relevance to Human Disease. Sem Liver Dis 1999; 19:243-252.
9. DEAL PH, RICHARDSON PC, SWENBERG JÁ. Dose response of hepatocyte replication in rats following continuous exposure to dietylnitrosamine. Cancer Res 1989; 19:6985-88.
10. STEWART HL, WILLIANS G, KEYSSER CH. Histologic typing of liver tumors of the rat. J Natl Cancer Inst 1980; 64:177-206.
11. SIMILE, MM, MIGLIO MR, CALVISI D. Long-term dehydro-epiandrosterone and 16á-fluoro-5-androsten-17-one administration enhances DNA synthesis and induces expression of c-*fos* and c-Ha-*ras* in a selected population of preneoplastic lesions in liver of diethylnitrosamine-initiated rats. Carcinogenesis 2001; 21:301-308.
12. BANNASCH P. Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: Sequencial Cellular, Molecular, and Metabolic Changes. Progress Liver Dis. 1996; 14:161-197.
13. JOHNSON SH, BURR AW, TOOLE K. Macrofage and hepatic stellate cell responses during experimental hepatocarcinogenesis (Hepatocellular Carcinoma). J Gastroenterol Hepatol 1998; 13:145-151.
14. BRALET MP, PICHARD FN. Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in diethylnitrosamine-treated rats. Hepatology 2002; 36:623-30.
15. SHUKLA Y, ARORA A. Enhancing effects of mutard oil on preneoplastic hepatic foci development in wistar rats. Hum Exp Toxicol 2003; 22:51-5.
16. RAO MS, KASHIREDDY P. Effect of castration on dehydroepiandrosterose-induced hepatocarcinogenesis in male rats. Anticancer Res 2002; 22:1409-11.
17. TSUJIUCHI T, SASAKI Y, OKA Y, KONISHI Y, TSUTSUMI M. Fhit gene alterations in hepatocarcinogenesis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. Mol Carcinog 2003; 36:147-52.