

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

FÁBIA REGINA NASCIMENTO FERNANDO BURGOS

ANÁLISE CLÍNICA CIRÚRGICA E HISTOPATOLÓGICA EM RATAS WISTAR (*Rattus  
novergicus albinus*) SUBMETIDAS À PINEALECTOMIA E N-NITROSO-N-  
METHYLUREA ISOLADOS E ASSOCIADOS

RECIFE

2014

FÁBIA REGINA NASCIMENTO FERNANDO BURGOS

ANÁLISE CLÍNICA CIRÚRGICA E HISTOPATOLÓGICA EM RATAS WISTAR (*Rattus  
novergicus albinus*) SUBMETIDAS À PINEALECTOMIA E N-NITROSO-N-  
METHYLUREA ISOLADOS E ASSOCIADOS

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutora em  
Ciência Veterinária pela Universidade Federal Rural de  
Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Lopes de Almeida

RECIFE

2014

Ficha catalográfica

B957a Burgos, Fábila Regina Nascimento Fernando  
Análise clínica cirúrgica e histopatológica em ratas  
Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) submetidas à  
pinelectomia e N-nitroso-N-methylurea isolados e  
associados / Fábila Regina Nascimento Fernando Burgos. –  
Recife, 2014.  
80 f. : il.

Orientador: Edvaldo Lopes de Almeida.  
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
de Medicina Veterinária, Recife, 2014.  
Referências.

1. Procedimento cirúrgico 2. Indução tumoral 3. Câncer  
de ovário I. Almeida, Edvaldo Lopes de, orientador II. Título

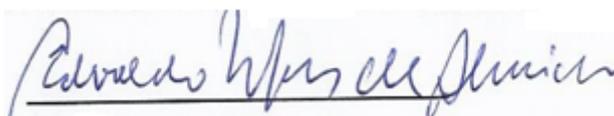
CDD 636.089

FÁBIA REGINA NASCIMENTO FERNANDO BURGOS

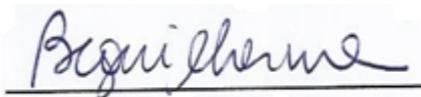
ANÁLISE CLÍNICA CIRÚRGICA E HISTOPATOLÓGICA EM RATAS WISTAR (*Rattus  
novergicus albinus*) SUBMETIDAS À PINEALECTOMIA E N-NITROSO-N-  
METHYLUREA ISOLADOS E ASSOCIADOS

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutora em  
Ciência Veterinária pela Universidade Federal Rural de  
Pernambuco.

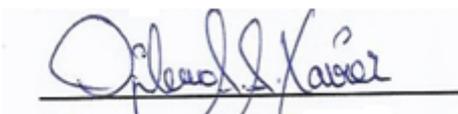
**BANCA EXAMINADORA**



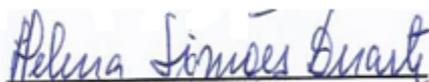
Prof. Dr. Edvaldo Lopes de Almeida



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Betânia Cristina Guilherme



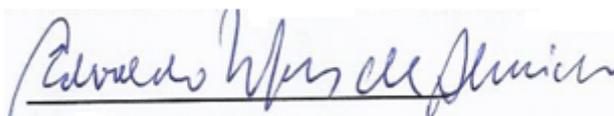
Prof. Dr. Gileno Antônio Araújo Xavier



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helena Simões Duarte



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosilda Maria Barreto Santos



Presidente da Comissão Examinadora

Prof. Dr. Edvaldo Lopes de Almeida

Orientador

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fábia Regina Nascimento Fernando Burgos, nascida em Recife-PE, em 20 de maio de 1980. obteve o Grau de Médica Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) - Sede no ano de 2003. Obteve o Título de Mestre em Ciência Veterinária – Área de concentração Clínica Cirúrgica pela UFRPE -Sede no ano de 2009, neste mesmo ano exerceu o Cargo de Professora Substituta na Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da UFRPE. Desde 2010 faz parte do quadro de docente efetivo, atualmente como professora Assistente II, na UFRPE –Sede.

*Dedico*

*Ao meu avô Arnaldo Moreira do Nascimento (in memoriam), a quem devo muito do que sou hoje.*

*À minha amada filha por tudo que foi vivido,  
sofrido e comemorando todos os dias ao seu  
lado nesta minha jornada do doutorado.*

*Agradecimento Especial*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Edvaldo Lopes de Almeida por simplesmente fazer parte da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*"E a paz de Deus, para a qual também fostes chamados em um corpo, domine em vossos corações; e sedes agradecidas." Colossenses 3 : 15.*

A Deus por me carregar nos braços em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais Valéria Virgínia e Bartolomeu Fernando pelo apoio, dedicação e confiança a cada etapa vivida.

Ao meu amado esposo Ronaldo Filho pela paciência e compreensão, pelo amor em tudo que fez e faz por mim.

À minha filha maravilhosa Ana Fábria pelos ensinamentos da sua tão jovem, mas complexa sabedoria.

À minha avó Risete Barreto pela companhia nas várias fases desta caminhada.

À minha irmã Virgínia Conceição pela atenção cedida nas tantas correções realizadas.

À minha amiga Juliete Lira pela presença nesta etapa de meu aperfeiçoamento, sem sua perseverança nada disso teria acontecido.

Ao meu eterno orientador Prof.Dr. Edvaldo Lopes de Almeida por existir em minha vida.

À minha família, tios (as), primos (as), sobrinho (as), sogro (as), madrinha, padrinho por sempre torcerem pela concretização do meu sucesso profissional. Especialmente à minha prima Eliane pela lição de vida dada na vitória de um câncer e à minha tia Letícia Borges (in memoriam), que sempre esteve em meus pensamentos.

Aos animais do biotério pela tão inocente e valiosa contribuição como fonte da minha pesquisa.

Ao Presbítero Ronaldo por sempre acreditar em mim e dar forças nos momentos difíceis mesmo a quilômetros de distância, provando que amigos não precisam estar perto para demonstrar seu companheirismo.

Às professoras Helena Simões e Janaína Couto por sábias palavras ditas em ocasiões especiais da minha vida. Ao Professor Rafael Freitas pelas inúmeras traduções e considerações sempre pertinentes.

Aos meus orientados Juliete Lira, Luis Palhares Neto, Lívia Geovane, Juliane Marine, Mateus Araújo, Débora Almeida, Erick Andrade , Jaciane Cadete, Juliana Maria e Renata Oliveira por contribuírem na realização deste trabalho.

Ao Paulo Roberto, Simone Regina, Sandra Torres e Edna Barros pelo profissionalismo nos procedimentos laboratoriais.

Aos Professores Fernando Leandro e Márcia Pereira pela atenção nas minhas análises histopatológicas. Ao Professor Frederico Maia por nos ceder equipamentos de microscopia e informática.

Aos professores da área de Histologia, assim como os seus orientados que sempre foram atenciosos e solícitos. Ao Professor Valdemiro Júnior pelas contribuições, apoio e considerações.

A todos os meus queridos amigos professores e técnicos da UFRPE pela força, carinho e atenção nos momentos que precisei para realização deste projeto.

Enfim, para todos aqueles que anonimamente, mas muito especial, contribuíram nesta vitória.

"Eis que faço uma coisa nova, agora sairá à luz;  
porventura não a percebeis? Eis que porei um  
caminho no deserto, e rios no ermo."

Isaias 43: 19

## SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
CAPÍTULO 2 - Pinealectomia em Ratas Wistar ( <i>Rattus norvegicus albinus</i> ) – Descrição de um novo método cirúrgico.	27
CAPÍTULO 3 - Estudo experimental de Ratas Wistar submetidas à pinealectomia e N-Nitroso-Methylurea associados ou como agentes únicos.	45

**LISTA DE TABELAS**

	página
Tabela 1 - Histórico dos principais autores que descreveram técnicas de pinealectomia de 1934 a 2009.	12 e 30
Tabela 2 - Relação entre animais operados e número de óbitos observados no período de maio a setembro de 2012.	38

## LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 - Desenho esquemático de ovário evidenciando histologicamente o ciclo de maturação em folículos ovarianos no córtex, assim como os vasos sanguíneos na medula.	07
Figura 2 - Desenho esquemático da localização da pineal (cabeça de seta) em Ratas Wistar.	08
Figura 3 - A – Fórmula do N-Nitroso-N-Methylurea. B – Modelo em varas do N- Nitroso-N-Methylurea. C – Modelo em esfera do N-Nitroso-N-Methylurea.	15
Figura 4 - Fotografia mostrando a Rata Wistar em decúbito ventral evidenciando a área cirúrgica após tricotomia e anti-sepsia.	32
Figura 5 - Fotografia demonstrando a realização da incisão na pele com o bisturi na linha média dorsal da cabeça desde a região interorbitária até a interauricular.	32
Figura 6 - Fotografia demonstrando a craniotomia com auxílio do micromotor de baixa rotação e broca de aço PM 03.	33
Figura 7 - Fotografia evidenciando o seio venoso sagital dorsal e os transversos em forma de Y. (seta).	34
Figura 8 - Desenho esquemático mostrando os seios venosos. Destaque para o seio venoso sagital dorsal (seta).	34
Figura 9 - Fotografia mostrando a ligadura dos seios venosos (seta).	35
Figura 10 - Fotografia mostrando tesoura cirúrgica reta romba 12cm utilizada no procedimento cirúrgico.	35
Figura 11 - Fotografia mostrando o Fórceps Cápsula Arruga empregado na pinealectomia.	35
Figura 12 - Fotografia demonstrando pele suturada em pontos simples com	36

fio 5-0 ABS Poliglactina.

- Figura 13 - Fotografia mostrando Rata Wistar envolvida por uma manta térmica no período imediato pós-cirúrgico. 37
- Figura 14- Fotografia mostrando as Ratas Wistar em movimentação após a recuperação anestésica. 37
- Figura 15 - **A:** Fotografia do tambor utilizado para descarte dos produtos e utensílios após a indução química. **B:** Camada de argila no fundo do tambor. **C:** Pó de serra adicionado acima da argila. **D:** Carvão vegetal na camada mais superficial. 51
- Figura 16- Ganho médio de peso dos animais do grupo II, III e IV. 54
- Figura 17 - Imagem tomográfica da cavidade torácia, ausência de massa tumoral. Visualização de costelas, coluna vertebral, coração e pulmão. 55
- Figura 18 - Imagem tomográfica da cavidade abdominal, ausência de massa tumoral. Visualização de alças intestinais e coluna vertebral. 55
- Figura 19 - Fotomicrografia de fragmento de ovário no qual se vê um epitélio simples cúbico revestindo todo órgão. Na região cortical a túnica albugínea e folículos em várias fases de maturação. Depósito de hemossiderina multifocal. Região medular com inúmeros vasos sanguíneos. Limitando externamente o mesovário (H.E. 40X). 57
- Figura 20 - Fotomicrografia de fragmento de ovário no qual se vê na região cortical quatro corpos hemorrágicos, um folículo maduro, um terciário com pequeno antro. Três folículos secundários. Região medular vascularizada entremeada por tecido conjuntivo frouxo (H.E. 40X). 57
- Figura 21 - Fotomicrografia de fragmento de ovário no qual se vê na região cortical dois corpos lúteos, um bem desenvolvido com células de núcleo picnótico e citoplasma vacuolizado em degeneração. Um corpo hemorrágico e depósito de hemossiderina multifocal. 58

(H.E. 40X).

Figura 22 - Fotomicrografia de fragmento de ovário no qual se vê um 58  
epitélio de revestimento simples cúbico seguido da túnica  
albugínea bem delimitada. Na região cortical dois folículos  
antrais bem desenvolvidos. Três corpos lúteos, um com  
hemossiderina. Região medular com inúmeros vasos.  
Externamente fímbrias da tuba uterina (H.E. 100X).

**LISTA DE ABREVIATURAS**

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMBA - 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene

EPI - Equipamento de proteção individual

H.E - Hematoxilina e Eosina

NMU - N-Nitroso-N-Methylurea

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Solução salina tamponada

PL - Peroxidação Lipídica

$\gamma$  - Gama

ANÁLISE CLÍNICA CIRÚRGICA E HISTOPATOLÓGICA EM RATAS WISTAR (*Rattus  
novergicus albinus*) SUBMETIDAS À PINEALECTOMIA E N-NITROSO-N-  
METHYLUREA ISOLADOS E ASSOCIADOS

**RESUMO** - No Brasil e no mundo, o câncer é uma patologia que ganha relevância pelo seu perfil epidemiológico. Por esse sentido, o tema se torna atraente para novos estudos, conquistando espaço no meio científico com destaque para o câncer de ovário por ser uma das neoplasias malignas de prognóstico reservado. A pineal é uma minúscula glândula endócrina que produz melatonina. Acredita-se que este derivado da serotonina exerça um efeito supressivo na secreção de gonadotrofinas, e por isso iniba o crescimento e a função das gônadas. Vários estudos têm avaliado a ação da pineal em animais experimentais submetidos pinealectomia sob diferentes protocolos anestésicos, instrumentais cirúrgicos e materiais de sutura. O N-Nitroso-N-Methylurea (NMU) tem ação cancerígena direta, induzindo tumores em várias espécies em diversos órgãos. Objetivou-se estabelecer um modelo experimental para indução de tumores nos ovários de 36 Ratas Wistar, em 6 grupos, subdivididas de acordo com a idade. Pinealectomizadas e não pinealectomizadas, e NMU associados ou como agentes únicos. Conclui-se que os aprimoramentos da técnica cirúrgica de pinealectomia são aplicáveis em Ratas Wistar, no entanto, o modelo experimental de carcinogênese ovariana em Ratas Wistar, utilizando o NMU intraperitoneal associado ou não à pinealectomia mostrou inviabilidade prática neste estudo, devido a ausência de tumores. Tem-se a perspectiva de que este trabalho sirva de subsídio para o aperfeiçoamento e otimização do modelo experimental de agentes indutores tumorais ovarianos e, a partir destes, possíveis tratamentos.

Palavras-chave: Procedimento cirúrgico. Indução tumoral. Câncer de ovário.

ANALYSIS AND SURGICAL CLINIC HISTOPATOLOGICAL IN FEMALE WISTAR RATS (*Rattus norvegicus albinos*) AND SUBMITTED PINEALECTOMY N-NITROSO-N-METHYLUREA ISOLATED AND ASSOCIATED

**ABSTRACT** - In Brazil and in the world, cancer is a condition that becomes relevant for its epidemiological profile. In this sense, the theme becomes attractive to new studies, gaining momentum in the scientific community with an emphasis on ovarian cancer as one of the malignancies with a poor prognosis. The pineal gland is a tiny endocrine gland that produces melatonin. It is believed that this derivative of serotonin exerts a suppressive effect on gonadotropin secretion and therefore inhibits the growth and function of the gonads. Several studies have evaluated the action of the pineal pinealectomy in experimental animals submitted under different anesthetic protocols, surgical instruments and suture materials. The N-nitroso - N - Methylurea (NMU) has direct carcinogenic action, inducing tumors in various organs in various species. Objective was to establish an experimental model for induction of tumors in the ovaries of 36 Wistar rats into 6 groups, subdivided according to age. Pinealectomizadas not pinealectomizadas and NMU members or as single agents. It is concluded that the improvements in the surgical technique of pinealectomy are applicable in Wistar rats, however, the experimental model of ovarian carcinogenesis in Wistar rats, using with or without pinealectomy intraperitoneal NMU showed practical impossibility in this study due to the absence of tumors. There is the prospect that this work will serve as input for the improvement and optimization of the experimental model of ovarian tumor -inducing agents and, from these, possible treatments.

Keywords: Surgical procedure. Tumor induction. Ovarian cancer.

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **INTRODUÇÃO**

A literatura consultada revela que muitos tópicos importantes para nortear a pinealectomia e o uso do NMU, continuam sendo motivo de interesse dos pesquisadores. No que se refere à carcinogênese por NMU em ratas pinealectomizadas o assunto ainda carece de mais evidências. Assim, propõe-se verificar os possíveis efeitos do NMU e da pinealectomia, individualmente e associados, com o objetivo de verificar seus potenciais na promoção de efeitos tumorais a fim de se disponibilizar informações que possam se tornar úteis à elucidação de tratamentos a partir do diagnóstico precoce melhorando a perspectiva de vida.

Inúmeras são as probabilidades a respeito dos tratamentos para o câncer, entretanto cada vez mais se percebe a tendência dos cientistas em admitirem que jamais exista um remédio único capaz de matar ou destruir todo e qualquer tipo de câncer. Esta certeza vem de outra certeza, qual seja que o câncer não é uma doença única, são muitas. Cada tipo é um tipo e reagirá de forma diferente. As maiores expectativas, no entanto, estão sendo depositadas em associações de medicamentos, com drogas diferentes, de efeitos distintos, mas que produzam bons resultados.

Os tumores ovarianos não apresentam sinais clínicos e sintomas específicos. Além disso, não há disponibilidade de adequadas técnicas de triagem, o que explica a alta taxa de mortalidade. A história natural do câncer de ovário é caracterizada por sintomas tardios, resposta insatisfatória ao tratamento e prognóstico sombrio. O diagnóstico de câncer de ovário tem sido uma sentença de óbito e, embora nas últimas décadas tenhamos conseguido regimes terapêuticos capazes de controlar melhor a doença, ainda não foi possível desenvolver um teste capaz de identificar a doença em fase precoce.

Muitos dos processos celulares interdependentes do corpo estão integrados e regulados através da atividade secretora de células do sistema endócrino, que representam uma ampla rede de comunicações por todo o corpo, basicamente uma extensão de longa duração e de longo alcance do sistema nervoso. Ele fornece numerosos sinais, de avanço ou de parada, graduados ou absolutos, para uma variedade de importantes atividades celulares.

Tal comunicação intercelular de larga escala envolve a disseminação de moléculas sinalizadoras por distâncias relativamente longas através da circulação sanguínea e assegura que os importantes processos do organismo sejam todos realizados de uma maneira cuidadosamente coordenada, que seja apropriada para as necessidades do corpo de um modo geral. A pineal é uma minúscula glândula endócrina responsável pela produção da melatonina, que exerce um efeito supressivo na secreção de gonadotrofinas, e por isso acredita-se que iniba o crescimento e a função das gônadas feminina e masculina.

São reconhecidas as ações de carcinógenos usados na medicina para a indução tumoral em diversos órgãos. O principal grupo de agentes indutores da carcinogênese é representado pelas espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, outros radicais livres e produtos da peroxidação lipídica que induzem diversas injúrias celulares e nucleares. Um dos principais representantes o DMBA inicialmente desenvolvido, no entanto por desenvolver uma maior quantidade de tumores benignos e não produzirem metástase elaboraram o NMU como agente químico carcinogênico pela sua ação através da transferência de um grupo metil para a sua nucleobase em ácidos nucléicos, o que pode conduzir as mutações. Adjunto, seus efeitos sobre diversos órgãos, como as mamas, os ovários têm sido alvo de investigações.

## REVISÃO DE LITERATURA

A palavra câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a.C. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias comprova que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo (INCA, 2011).

De um modo geral, o termo câncer é empregado para designar mais de uma centena de diferentes doenças heterogêneas que, segundo Hanahan e Weinberg (2000), surgem a partir de alterações essenciais na fisiologia da célula, as quais, coletivamente, contribuem para o crescimento dos tumores malignos, dentre as alterações essenciais podem ser citadas a suficiência em relação aos fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão à morte celular programada por apoptose, potencial ilimitado de replicação, angiogênese aumentada, invasão tecidual e disseminação à distância (metástase).

As neoplasias são sem dúvida e há muito tempo, consideradas uma das mais importantes doenças e que mais acomete as espécies humana e doméstica, com registros de ocorrência em cerca de sete papiros egípcios datando de 16 séculos antes de Cristo, sendo que um deles, o “papiro de Edwin Smith”, relata a realização de uma mastectomia (GUTEMBERG, 2004).

Há evidências de câncer em restos humanos ancestrais e na literatura médica desde a antiguidade, datados de antes da época dos faraós no Egito antigo. Embora seja difícil interpretar o diagnóstico de médicos que viveram há tantos séculos atrás, pode-se assumir que muitas das suas descrições eram relacionadas a casos de câncer (NOBILI *et al.*, 2009).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 10 milhões de casos de câncer surgem a cada ano, causando mais de 6 milhões de óbitos, sendo a terceira causa de morte no Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e aponta a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos

de câncer da pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. (INCA, 2011; SILVA, 2012).

Em função do crescimento populacional, mudanças nos hábitos de vida e processo de industrialização houve um aumento da taxa de mortalidade por câncer nos últimos anos. Devido a isso o câncer é considerado um problema de saúde pública e esforços devem ser mobilizados para sua prevenção e cura (KAPIL *et al.*, 2004).

A longevidade é um fator muito importante no aparecimento desta doença e à medida que a humanidade torna-se mais idosa, sua incidência aumenta. Na espécie humana, juntamente com as doenças cardiovasculares são indubitavelmente as duas maiores causas de morte, estimando-se números da ordem de 10 milhões de pessoas/ano (SANTOS, 1986). No Brasil são 400.000 novos casos e 125.000 mortes anuais (GUTEMBERG, 2004).

Desde 1930, a análise de dados relativos ao índice de mortalidade no Brasil mostra que, os tumores malignos e as doenças do aparelho circulatório, são responsáveis por um número cada vez maior de óbitos, apontando para uma mudança no perfil relativo ao índice de mortalidade semelhante àquela observada nos países desenvolvidos (PISANI *et al.*, 2002).

A maioria das células normais crescem, multiplicam-se e morrem de maneira ordenada. As células cancerosas, em vez de morrerem, continuam crescendo incontrolavelmente, formando outras novas células anormais. Diversos organismos vivos podem apresentar, em algum momento da vida, anormalidade no crescimento celular acarretando transtornos funcionais (INCA, 2011).

As causas primárias ainda não estão muito bem esclarecidas, mas as neoplasias surgem devido às mutações genéticas espontâneas ou induzidas provenientes da exposição do organismo a vários fatores carcinogênicos, sendo esta ação classificada em carcinogênese biológica, a física e a química (JONES *et al.*, 2000; BARBOSA, 2006).

Provocando desordem no ciclo celular, ocorrendo excesso na taxa de proliferação e deficiência nas taxas de morte celular, este processo culmina com a formação de agrupamentos de clones de células neoplásicas, isto é, tumores (CAVENEY & WHITE, 1995; FERRARI & TORRES, 2002).

Belizário (2002), trata em seu trabalho, o câncer como uma doença genética, por se ocorrer a transmissão de genes tumorais, ou seja os oncogenes, para células normais. Ainda afirmou que a mutação pode ocorrer por produtos tóxicos da própria célula, denominados radicais livres.

Como resultado de instabilidades cromossômicas, modificações epigenéticas e acúmulo de mutações há uma elevação das taxas de proliferação e dano celular, tendo como produto uma crescente deterioração ao sistema que regula o crescimento e a morte celular (SORLIE, 2004). A doença caracteriza-se pelo crescimento anômalo e desordenado de células, sem finalidade e sem controle do organismo através do qual se nutre, e que persiste nesta prevalência mesmo cessado o estímulo que determinou tal alteração (SANTOS, 1986).

Então, o câncer é resultante do crescimento de sucessivas populações celulares nas quais as mutações se acumularam em um processo denominado de expansão monoclonal. Este processo culmina na formação de uma massa tumoral com células contendo diferentes padrões de alterações genéticas e com extensa heterogeneidade intra-tumoral e de paciente para paciente, mesmo para subtipos histologicamente idênticos. Assim, o câncer é uma doença associada a alterações genéticas múltiplas, originando-se a partir de uma única célula normal que acumulou mutações após sucessivas divisões celulares num processo de evolução clonal (CAVENEY & WHITE, 1995).

Atualmente o câncer de ovário é o tumor ginecológico mais difícil de ser diagnosticado e o de menor chance de cura. Cerca de 3/4 dos cânceres desse órgão apresentam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico. A maioria dos tumores de

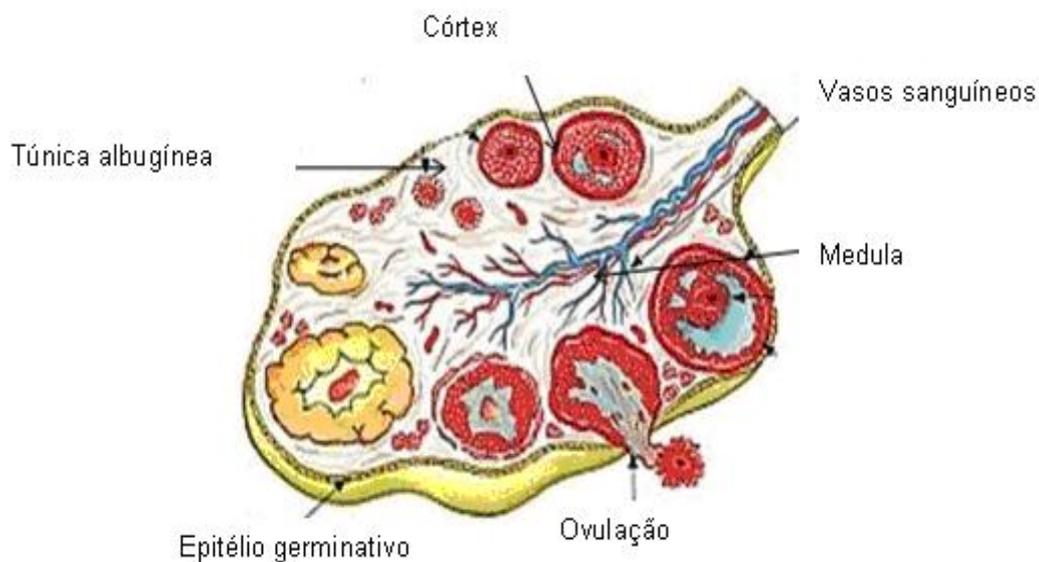
ovário são carcinomas epiteliais que se inicia nas células da superfície do órgão também conhecido por tumor maligno de células germinativas (INCA, 2013).

Consiste na oitava neoplasia maligna mais diagnosticada em mulheres no Brasil e a quinta causa de morte por câncer em mulheres americanas (SILVA-FILHO *et al.*, 2004). É responsável por 6% dos cânceres que atingem as mulheres, sendo o terceiro mais incidente no aparelho genital feminino em países desenvolvidos, ficando abaixo apenas do carcinoma do colo do útero e de endométrio (TORRES *et al.*, 2002), correspondendo a 1,8% dos cânceres ginecológicos e apresentando elevada mortalidade (LINASMITA *et al.*, 2004). Os dados de prevalência acumulada ao longo da vida, desde o nascimento até 85 anos de idade, mostram que a probabilidade de ocorrência do câncer de ovário é de 1,5% (WHITTEMORE, 1994).

O ovário é um órgão glandular exócrino pela sua produção de óvulos e endócrino por produzir os hormônios ovarianos principalmente estrogênios e progesterona. A estrutura do ovário normal varia grandemente com as espécies, idade e fase do ciclo sexual (PRIEDKALNS, 1982). Até a menopausa, os ovários após a puberdade contêm os folículos ovarianos, que apresentam vários estágios de maturação (COMARCK, 2008).

É um órgão ovóide dividido em córtex externo e medula interna (Figura 1), no córtex de tecido conjuntivo no qual os folículos e corpos lúteos se encontram (PRIEDKALNS, 1982), consiste principalmente em células do estroma semelhantes a fibroblastos, de formato fusiforme, entremeadas com finas fibras colágenas e dispostas em um característico padrão espiralado. Próximo ao epitélio simples cúbico da superfície dos ovários, entretanto, as células e fibras do estroma estão dispostas mais ou menos paralelas à superfície e constitui uma camada fibrosa externa esbranquiçada, denominada túnica albugínea, do latim *albus* = branco (COMARCK, 2008). Nos roedores o estroma cortical contém células glandulares intersticiais (PRIEDKALNS, 1982),

A medula é a área interna contendo nervos, grandes e numerosos vasos sanguíneos espiralados e vasos linfáticos. Consiste em tecido conjuntivo frouxo e fibras musculares lisas que são contínuas com as do mesovário (PRIEDKALNS, 1982). A medula do ovário contém alguns vasos sanguíneos relativamente grandes, notavelmente artérias enoveladas e veias contorcidas (COMARCK, 2008).



**Figura 1** – Desenho esquemático de ovário evidenciando histologicamente o ciclo de maturação em folículos ovarianos no córtex, assim como os vasos sanguíneos na medula.

Sendo os ovários órgãos duplos e pequenos, situados na pélvis feminina, o diagnóstico de tumores iniciais através de exame clínico na consulta ginecológica é difícil. Além disso, o câncer de ovário não causa sintomatologia e quando isso ocorre, é provável que a doença esteja em estágio avançado ou tenha se expandido além dos ovários. Assim, 70% dos diagnósticos para câncer de ovário são tardios (TORRES *et al.*, 2002).

As opções de tratamento são restritas a cirurgia citorrredutora e a quimioterapia baseada nos derivados da platina. Estas modalidades terapêuticas são apenas parcialmente efetivas e, conseqüentemente, a maioria das pacientes apresentará recorrência e óbito em função da doença (REIS, 2005).

A glândula pineal (Figura 2) localiza-se abaixo do corpo caloso e diferentemente das outras glândulas é controlada pelo núcleo supraquiasmático situado no hipotálamo, considerado o principal relógio biológico dos mamíferos (REITER *et al.*, 1989; SKENE *et al.*, 2006), atuando sobre diversos sistemas, como reprodutor feminino e masculino (REITER *et al.*, 1989). Outras funções do corpo pineal incluem uma ação inibidora da melatonina na glândula tireóide e uma intervenção, muito questionável, na regulação da secreção da aldosterona no córtex adrenal. No sistema nervoso central, parece induzir ao sono e ao aumento da serotonina em determinadas áreas do cérebro (DELLMANN, 1982).



**Figura 2-** Desenho esquemático da localização da pineal (cabeça de seta) em Ratas Wistar.

Anatomicamente tem a forma de um cone de pinha sendo um órgão parenquimatoso, derivado do teto diencefálico caudal que se projeta posteriormente no tronco cerebral. A pineal é uma estrutura responsável pela transmissão de informação fotoperiódica ao organismo, e exerce papel regulatório sobre os mais diversos eventos fisiológicos, metabólicos e comportamentais (PERES, 1996).

De origem neuroectodérmica, exerce efeitos sutis, mas definitivos, de regulação sobre a LH, FSH e síntese de prolactina, controlando ou modulando os ritmos reprodutores

sazonais, provavelmente, em todos os mamíferos, e até influenciando os constituintes cerebrais e a transmissão sináptica (DELLMANN, 1982).

Este pequeno apêndice encefálico mediano é uma minúscula glândula endócrina que produz a melatonina. Acredita-se que este derivado da serotonina ou de algum mediador relacionado, semelhante a um hormônio, exerça um efeito supressivo na secreção de gonadotrofinas, e por isso iniba o crescimento e a função das gônadas (DELLMANN, 1982; CORMACK, 2008).

A ação inibidora da pineal é devida à melatonina, concentrada nas gônadas do macho e da fêmea. Contudo, a modalidade íntima da ação é desconhecida. Como a melatonina também é admitida pelo cérebro e pela hipófise, é possível que a referida substância exerça seus efeitos através de determinados centros hipotalâmicos que bloqueiam a síntese e/ou liberação de substâncias neurotransmissoras na eminência mediana. Desta forma, a pineal é um órgão que recebe informações através de impulsos nervosos, causando a liberação de neurotransmissores que, por sua vez, induzem a atividade secretora endócrina. Sendo assim participa esta característica com a medula adrenal e com as partes do hipotálamo que recebem suas informações, predominantes, através de trajetos nervosos (DELLMANN, 1982).

A glândula pineal dos vertebrados é um componente essencial do sistema fotoneuroendócrino, que permite aos vertebrados inferiores até os seres humanos apreenderem a ritmicidade da passagem do tempo. Como estrutura, é conhecida desde a antiguidade, sendo mencionada nos estudos anatômicos de Galeno (THIEBLOT *et al.*, 1966).

O principal produto da pineal é a melatonina (BROWN, PANG, PANG *et al.*, 1994), que foi também o primeiro composto biologicamente ativo identificado na glândula (SILMAN, *et al.*, 1979). A atividade da melatonina se intensifica durante a noite, sendo reduzida a quantidade do hormônio durante o dia (SUMAYA, *et al.*, 2005; MAGANHIN, *et al.*, 2009; FALCÓN *et al.*, 2009).

A iluminação contínua causa uma diminuição no peso corporal do corpo pineal. Os pinealócitos parecem pequenos, com pouco citoplasma basófilo. A luz contínua também possui um efeito estimulante sobre o sistema reprodutor, conforme comprovado pela maturidade sexual adiantada, início da temporada de acasalamento anual fora do ciclo, e assim por diante. Como a pinealectomia causa os mesmos efeitos nas gônadas que a luz contínua, isso indica que o corpo pineal produz uma substância inibidora das gônadas (DELLMANN, 1982).

A atividade secretória da glândula pineal apresenta um ritmo circadiano relacionado com o período escuro (noite), cuja duração, variando ao longo do ano, de acordo com as estações, determina um padrão secretório com variações diárias e sazonais. Estas características de secreção determinam o papel fisiológico da glândula pineal em sinalizar para o meio interno, pela presença ou ausência de melatonina nos líquidos corporais, se é dia ou noite no meio exterior e sinalizar, pelo perfil diário do hormônio, qual a estação do ano. Desta forma, a pineal confere ritmos a uma série de funções neuroendócrinas que modula, determinando, por exemplo, o ciclo sono-vigília, a atividade reprodutora e a atividade metabólica de várias espécies (BARTNESS & GOLDMAN, 1989).

A melatonina, hormônio de natureza indólica, altamente conservada na evolução é produzida em mamíferos primariamente pela glândula pineal, e age como sincronizador endógeno do ritmo circadiano do organismo (ARENDRT, 2003), com aplicações médicas para aliviar os sintomas de “jet leg” {alteração de ritmo circadiano} (PARRY, 2002), e tratamento de desordens rítmicas (KARASEK *et al.*, 2002). Em 1982 o pesquisador DELLMANN afirmou que se o corpo pineal atua como um “relógio biológico”, influenciando ou regulando os ritmos diurnos, ainda está para ser definitivamente estabelecido, mas parece que esta poderia ser uma de suas principais funções, se não a mais importante.

A quantidade da secreção de melatonina noturna em pacientes com câncer de mama fica severamente reduzida (TAMARKIN *et al.*, 1982). Este hormônio é um poderoso antioxidante que não só neutraliza o radical hidroxil (TAND *et al.*, 2002; HUSSEIN *et al.*, 2005), como também inibe a produção de óxido nítrico pela redução da oxidonitricosintase (STASICA *et al.*, 1998). A melatonina pode modular a resposta imune e inibir o desenvolvimento de câncer hormônio dependente (MAESTRONI & CONTI, 1989).

Estudo realizado com ratas submetidas à administração de melatonina, ácido retinóico e *Nigella sativa*, demonstrou que estas substâncias reduziram os efeitos carcinogênicos do DMBA (dimetilbenzantraceno), sugerindo que estas substâncias possuem efeito protetor (ABD El AZIZ *et al.*, 2005).

A melatonina atua como modulador do sistema imune e tem ação antigonadotrófica, atua no tecido ósseo e possui um potente efeito antioxidante (REITER, 1996; REITER *et al.*, 2003; SOFIC *et al.*, 2005; REITER *et al.*, 2007).

Um dos grandes desafios no tratamento do câncer com as drogas convencionalmente utilizadas é o de se conseguir a destruição das células tumorais com mínimos efeitos colaterais sobre os tecidos e órgãos saudáveis. De maneira geral as drogas anticancerígenas têm efeito citotóxico comprovado em decorrência do estresse oxidativo-peroxidativo promovido por sua utilização (SÁNCHEZ-BARCELÓ *et al.*, 2003; ABD EL AZIZ *et al.*, 2005; PADMAVATHI *et al.*, 2006).

Tratamento preventivo utilizando melatonina em ratas Sprague-Dawley submetidas à indução de carcinoma mamário através do DMBA proporcionou aos autores admitirem a possibilidade de redução do risco de câncer de mama em mulheres por fatores ambientais não identificados (LENOIR *et al.*, 2005).

Dados revisados mostram o importante papel da glândula pineal no desenvolvimento do câncer de mama. A inibição da função da pineal com a pinealectomia ou com a exposição

ao regime de luz constante estimula a carcinogênese mamária, enquanto a privação de luz inibe a carcinogênese (ANISIMOV, 2002).

Um aumento significativo no peso do ovário, diversas semanas após a pinealectomia, bem como a puberdade precoce, são efeitos observados se o corpo pineal for removido dentro de 30 dias após o nascimento; após isso, não é observado nenhum efeito (DELLMANN, 1982).

Com o desenvolvimento das pesquisas envolvendo a glândula pineal procedimentos cirúrgicos vem sendo realizados (Tabela 1). É de se reconhecer na maioria dos casos o problema da rápida hemorragia de forma fatal envolvendo os seios da dura-máter. A técnica ideal para remoção da pineal deve-se no estancamento do sangramento, na curta duração da cirurgia, na apresentação de uma visão clara da glândula pineal no local da operação facilitando a sua extirpação e diminuindo a probabilidade de danos acidentais nas estruturas neurais adjacentes (KUSZAK & RODIN, 1977).

**Tabela 1:** Histórico dos principais autores que descreveram técnicas de pinealectomia de 1934 a 2009.

AUTOR	ANO	NÚMERO DE ANIMAIS	CRANIOTOMIA	BROCA	PINEALECTOMIA	FIOS PARA OS SEIOS VENOSOS	FIOS PARA A PELE
ANDERSEN E WOLF	1934	125	quadrado	lanceta	Pinça	não ligou	sem descrição
DAS GUPTA E TERZ	1967	114	quadrado	circular	pinça de relojoeiro	7-0 seda	catgut cromado 4-0
KUSZAK E RODIN	1977	200	retangular	broca nº 05	pinça de relojoeiro e estereotáxico D. KOPF, TUJUNGA, CA	fio cirúrgico 6-0	clipes de ferida MICHEL
EVÊNCIO-NETO	1998	36	circular	tronco cônica	lupa e pinça de relojoeiro	catgut 5-0	polipropileno 3-0
SOARES JÚNIOR et al.	1999	20	sem descrição	circular	pinça apropriada e estereotáxico	sem descrição	sem descrição
MAGANHIN et al.	2009	80	circular	sem descrição	lupa e pinça curva	catgut simples 5-0	polipropileno 3-0

Andersen & Wolf (1934) além de realizarem experimentos com ratos pinealectomizados, descreveram um estudo crítico da literatura com os primeiros estudos do procedimento cirúrgico em cachorro, ratos, cobais, coelho, pintinho e sapo, desde a primeira década do século passado.

Soares Júnior e colaboradores (1999) realizaram a pinealectomia em ratas adultas, virgens, pesando de 150 a 200g. Os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico na dosagem de 40mg/kg por via intraperitoneal. Após anti-sepsia da parte superior da cabeça do animal e fixação do mesmo ao aparelho estereotáxico, procedeu-se à abertura da pele e do tecido subcutâneo até atingir o crânio, expondo-se a região do lambda. A seguir, a craniotomia foi feita com broca circular, expondo-se o encéfalo e retirando-se a pineal com pinça apropriada. O fragmento da calota craniana foi recolocado no local e realizada sutura em plano único da pele. A profilaxia contra infecções no pós-operatório foi feita com a administração de Pentabiótico na dosagem de 0,4 mL por animal, por via intramuscular.

O principal grupo de agentes indutores da carcinogênese é representado pelas espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, outros radicais livres e produtos da peroxidação lipídica (PL) que induzem diversas injúrias celulares e nucleares (ESTERBAUER, 1993; FERRARI, 2001).

Os indutores tumorais são classificados em carcinógenos biológicos, físicos e químicos. A carcinogênese biológica é ocasionada por bactérias, parasitas e por vírus os quais possuem características propensas a causarem câncer por acarretarem mutações no DNA ou RNA (ZANINI *et al.*, 2004).

Quanto à carcinogênese física, esta ocorre a partir da exposição rara ou contínua do organismo a radiações ionizantes e não ionizantes. Essa radiação possui a capacidade de induzir mutações. Dentre as radiações que proporcionam um grande risco destacam-se a solar,

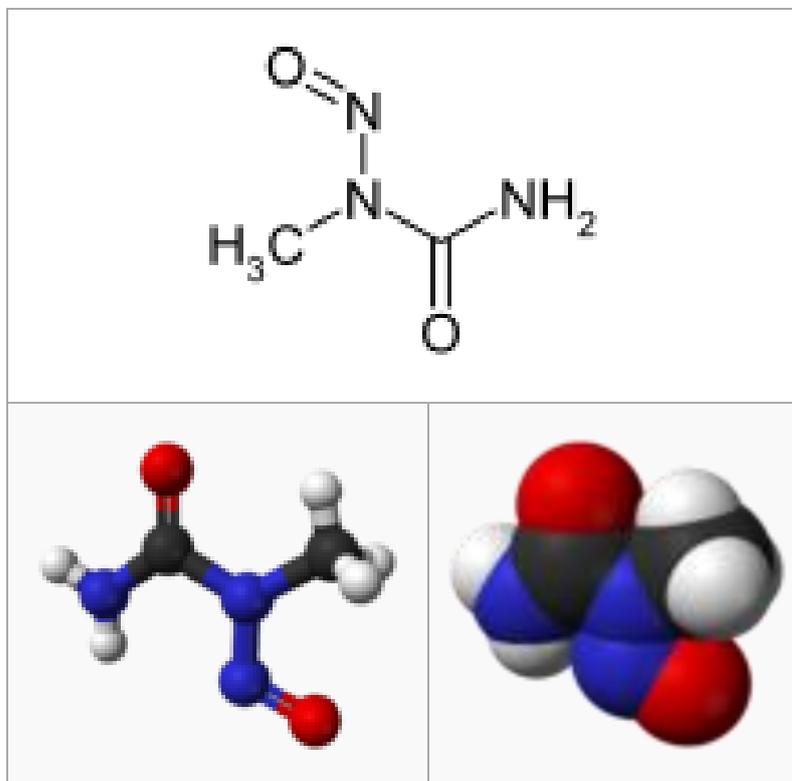
a ionizante, a por partículas alfa, a por nêutrons e as radiações eletromagnéticas como os raios  $\gamma$  e X (FONSECA *et al.*, 2012).

A carcinogênese química consiste em um método sequencial o qual é dividido nas etapas de iniciação e promoção. A etapa inicial é baseada a partir de um fator carcinógeno que promove o dano na célula ou sua mutação. O processo de mutação do DNA é a fase principal desta etapa onde as células “iniciadas” permanecem latentes até que os agentes promotores atuam sobre elas. Durante a etapa da promoção ocorre o estímulo do desenvolvimento celular que tenha sofrido mutação, podendo dar início a modificação celular. Este processo não age de forma mutagênica nem carcinogênica, mas precisa estar no ambiente para desempenhar seu efeito biológico. Os fatores inclusos nesta etapa podem ser químicos, processo inflamatório, hormônios e fatores que ajam no prolongamento normal da célula (BARBOSA, 2006).

A maioria dos tumores induzidos por 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) são benignos, e devem ser classificados como fibroadenomas (McCORMICK & MOON, 1965 apud THOMPSON & SPORN, 2002), além disso, não fazem metástase (GIULLINO *et al.*, 1975 apud THOMPSON & SPORN, 2002). As limitações com o uso do modelo de DMBA conduziu a uma procura por um carcinógeno mamário mais efetivo que induzisse tumores que são quase exclusivamente carcinomas. Em 1975, esta procura culminou com a introdução do N-Nitroso-N-methylurea como indutor de tumor mamário (GIULLINO *et al.*, 1975 apud THOMPSON & SPORN, 2002).

O N-Nitroso-N-Methylurea, constituído pela fórmula molecular  $C_2H_5N_3O_2$  (Figura 3) e peso molecular  $103,08g\ mol^{-1}$ , é um agente de alquilação, e exibe a sua toxicidade através da transferência de um grupo metil para a sua nucleobase em ácidos nucléicos, o que pode conduzir a mutações. Consiste em um cancerígeno já testado em alguns animais como os camundongos, ratos, hamsters europeus, coelhos, porcos, cães e macacos. Ele induz tumores benignos e malignos após a sua administração por diferentes vias, incluindo a ingestão,

produzindo tumores em diferentes locais como tecido nervoso, estômago, esôfago, pâncreas, trato respiratório, intestino, pele e rim. É cancerígeno na sequência da sua administração pré-natal e numa única dose (IARC, 1998).



**Figura 3- A** – Fórmula do N-Nitroso-N-Methylurea. **B** – Modelo em varas do N-Nitroso-N-Methylurea. **C** – Modelo em esfera do N-Nitroso-N-Methylurea

Em 1994 Cha, Thilly e Zarbl desenvolveram um experimento com ratas Fischer 344 tratadas com 30 mg/kg intravenoso de NMU, utilizando a veia caudal para a administração. A primeira lesão mamária macroscópica foi diagnosticada aos 90 dias após a indução.

Yamamoto e colaboradores (1998) descreveram que apenas uma única dose de 75mg/kg de N-Nitroso-N-Methylurea (NMU) induziu neoplasia mais do que cinco doses de 15mg/kg, causando lesões no baço, fígado e medula óssea. Linfomas malignos, adenomas do pulmão, papilomas e carcinomas na pele (USUI *et al.*, 2001 apud LONG *et al.*, 2010).

Mann e colaboradores (2010) diagnosticaram carcinoma mamário, após necropsia e esfola da pele para preparação histológica, em ratas administradas com NMU (50mg/kg) via

intraperitoneal aos 21 dias de idade. Nestes estudos comprovaram que a incidência e multiplicidade de câncer foram reduzidas em ratas submetidas à atividade física em roda giratória quando comparadas com animais sedentários.

Yoshizawa e colaboradores (2009), ao administrarem em ratos com 5 a 8 semanas de idade, uma dose única do NMU (60mg/kg/ intraperitoneal), diluído em solução salina fisiológica contendo 0,05% de ácido acético, verificaram o atrofia do timo, baço, nódulos linfáticos e medula óssea. No entanto Goss *et al.* (2007) dissolveram o NMU em cloreto de sódio a 0,9% acidificado ao pH4 com ácido acético 20 minutos antes da administração intraperitoneal em ratas Sprague-Dawley aos 50 dias de idade.

Takami *et al.* (2010) realizaram a indução do câncer em ratos com NMU (40mg/kg) aos sete dias de idade. Os tumores apareceram a partir da quinta semana da administração do NMU e por palpação foram identificados tumores na região torácica e abdominal.

Long *et al.* (2010) relataram elevada taxa de mortalidade e o desenvolvimento de exuberantes alterações hematoproliferativas no baço incluindo displasia e neoplasia em ratos tratados com uma única dose (75mg/kg) de NMU entre a 7<sup>a</sup> e 11<sup>a</sup> semana de idade. A maioria das mortes foram associadas principalmente a linfomas e neoplasias do trato gastrointestinal.

Em um modelo experimental de câncer mamário, Gal, Baba e Miclaus (2011), utilizaram duas raças de ratas aos 37 dias de idade, tais com Sprague Dawley (n=10) e ratos Wistar (n=9). Os animais receberam uma única dose (55mg/kg) intraperitoneal de NMU. Após oito meses de observação realizou-se a eutanásia das ratas e foram colhidas amostras para exame histopatológico. Concluíram que a raça de rato mais apropriada para o modelo experimental em tela é a Sprague-Dawley visto que a incidência foi de 80% nestes animais. Por outro lado, em ratos Wistar a incidência do mesmo tumor foi de 33,3%, no entanto o NMU gerou uma grande variabilidade de outros tipos de tumores em diferentes tecidos e órgãos, tais como o nefroblastoma, lipossarcoma, carcinoma das glândulas brônquicas,

hemangiossarcoma, carcinoma epidermóide, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma do pulmão e lipoma.

Em outro experimento Gal, Baba e Catoi (2006) administraram em sete Ratas Wistar impúberes de 37 dias de idade 55 mg de NMU, em dose única. Os animais foram mantidos em ótimas condições de temperatura, alimentação e higiene durante 14 meses, quando então foram eutanasiados, e foram colhidas amostras para exame histopatológico. Deste modo, foram diagnosticados, carcinoma das glândulas brônquicas, carcinoma das glândulas sebáceas, nefroblastoma, lipossarcoma, hemangiossarcoma, lipoma, carcinoma escamoso, carcinoma pulmonar de células pequenas e adenoma mamário. Baseado nestes resultados concluíram que o NMU poderia induzir vários tipos de tumores em diferentes tecidos não só no tecido mamário.

Nos últimos anos, a preocupação com o bem-estar animal tem sido evidente, principalmente em relação ao uso de animais na experimentação científica (CLARK; REGER; CALPIN, 1997). A necessidade de um manejo adequado antes, durante e após a execução de procedimentos em animais de laboratório é essencial para proporcionar o bem-estar animal. Considerando a grande utilização de ratos como modelos experimentais nas mais diversas áreas, é fundamental para a qualidade das pesquisas, ensino e testes nos quais estes animais são utilizados, conhecer e minimizar as variáveis que poderão interferir nos resultados (UEZ, 2005).

## REFERÊNCIAS

ABD EL AZIZ, M. A. et al. The biochemical and morphological alterations following administration of melanin, retinoic acid and nigella sativa in mammary carcinoma: an animal model. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 86, p. 383-396, 2005.

ANDERSEN, D. H.; WOLF, A. Pinealectomy in rats with a critical survey of the literature. **Journal of Physiology**. 1934 Mar 29;81(1):49–62.

ANISIMOV, V. N. The light-dark regimen and câncer development. **Neuroendocrinology Letters**, Luxembourg v. 23, n. 2, p. 28-36, 2002.

ARENDRT, J. Importance and relevance of melatonin to human biological rhythms. **Journal of Neuroendocrinology**, Turin, n. 15, p. 427-431, 2003.

BARBOSA, N. B. V. **Efeito de compostos orgânicos de selênio em modelos experimentais de câncer e diabetes mellitus**. 2006. p. 165. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D. Mammalian Pineal melatonin: a clock for all seasons. **Experientia**, Basel, v. 45, p. 946-954, 1989.

BELIZÁRIO J. E. Reverter o câncer: o próximo desafio. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 184, p. 50-57, 2002.

BROWN, G.M.; PANG, C.S.; PANG, S.F. Binding sites for 2- [125I] iodomelatonin in the adrenal gland. **Biol Signals**; 3:91-8, 1994.

CAVENEY, W. K.; WHITE, R. L. The genetic basis of cancer. An accumulation of genetic defects can apparently cause normal cells to become cancerous and cancerous cells to become increasingly dangerous. **Scientific American**, New York, v. 272, p. 72-79, 1995.

CHA, R. S.; THILLY, W. G.; ZARBL, H. N- Nitroso-N-methylurea-induced rat mammary tumors arise from cells with preexisting oncogenic Hras1 gene mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, US, v. 91, p. 3749-3753, 1994.

CLARK, J.D.; REGER, D.R.; CALPIN, J.P. Animal well-being II. **Stress and Distress. Laboratorial Animal Science**, U.S.A., v.47, n.6, p.571-579, Dec.1997.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de Histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 371p.

DAS GUPTA, T. K.; TERZ, J. Influence of pineal gland on the growth and spread of melanoma in the hamster. *American Association for Cancer Research*. 1967; 27: 1306-1311.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, p. 779-786, 1993.

EVÊNIO-NETO, J. Efeito da melatonina na adrenal de ratas pinealectomizadas. Tese de doutorado 1998. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatório e Cirurgia Experimental, 1998.

DELLMANN, H-D. Sistema endócrino. In: Dellmann, H-D; Brown. *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap. 15, p. 295-316.

FALCÓN, J. et al. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann N Y Acad Sci.*;1163:101-11, 2009.

FERRARI, C. K. B. Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. **Internal Medicine Journal**, v. 8, p. 175-184, 2001.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 375-382, 2002.

FONSECA, A. L. et al. Dosagem de endoxifeno em pacientes com câncer de mama: novas ferramentas na monitorização terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, SP, v. 93, p. 415-421, 2012.

GAL, A. et al. Comparative aspects regarding MNU-induced mammary carcinogenesis in immature Sprague-Dowley and Whistar rats. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine**. Club-Napoca, v. 1, n. 68, p. 159-163, 2011

GAL, A. et al. Mammary induced carcinogenesis by methyl-nitroso urea in impubere whistar rats. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine**, Club-Napoca, v. 1-2, n. 63, p. 96-101, 2006.

GOSS, P. E. et al. Effects of liarozole fumarate (R85246) in combination with tamoxifen on N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced mammary carcinoma and uterus in the rat model. **BMC Cancer**, BioMed Central, v. 26, n. 7, p. 1-8, 2007.

GIULLINO, P. M.; PETTIGREW, H. M.; GRANTHAM, F. H. N-Nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, Md., US, v. 54, p. 401-414, 1975.

GUTEMBERG, T. Câncer, a humanidade contra-ataca. **Revista Superinteressante**, v. 206, p. 44-53, nov. 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. the hallmarks of cancer. *Cell*, 100, p.57-100, 2000.

HUSSEIN, M. R. et al. Ultrastructural evaluation of the radio-protective effects of melatonin against X-ray-induced skin damage in Albino rats. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 86, p. 45-55, 2005.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some N-Nitroso Compounds. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Vol. 17, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: *incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2013.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole Ltda, 2000. p. 1181–1182.

KAPIL, U. et al. Association of vitamin A, vitamin C and zinc with laryngeal cancer. **Indian Journal Cancer**, Bombay, v. 40, p. 67-70, 2004.

KARASEK, M. et al. Future of melatonin as a therapeutic agent. **Neuro Endocrinology Letters**, Luxembourg, n. 23, p.118-121, 2002. Suplemento.

KUSZAK, J.; RODIN, M. A new technique of pinealectomy for adult rats. **Experientia**, Basel, 1977, v.33, p.283-4.

LENOIR, V. et al. Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz(a)anthracene in the female Sprague-Dawley rat. **Breast Cancer Research**, London, v. 7, n. 4, p. 470-476, 2005.

LINASMITA, V.; PATTARAARCHACHAI, J.; DAENGDEELERT, P. Prognostic factors for survival of epithelial ovarian cancer. **International Journal Gynecology & Obstetrics**, Limerick, v. 85, p. 66-69, 2004.

LONG, G. G. et al. Hematopoietic proliferative lesions in the spleen of rasH2 transgenic mice treated with MNU. **Toxicology Pathology**, Lawrence, v. 38, p. 1026-1036, 2010.

MAESTRONI, G. J.; COUTI, A. Beta-endorphin and dynorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. **International immunopharmacology**, Amsterdam, NL, v. 11, p. 333-340, 1989.

MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; SIMÕES, M. J.; EVÊNCIO-NETO, J.; BARACAT, E. C.; SOARES, J. M. Rat pinealectomy. A modified direct visual approach. **Acta Cirúrgica Brasileira**. Periódico na internet. 2009. julho-agosto; 24 (4).

MANN, P. B. et al. Wheel running, skeletal muscle aerobic capacity and 1-methyl-1-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in the rat. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 1279-1283, 2010.

McCORMICK, G. M.; MOON, R. C. Effect of pregnancy and lactation on growth of mammary tumors induced by 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene (DMBA). **British Journal of Cancer, Edinburgh**, Inglaterra, GB, v. 19, p. 160-166, 1965.

NOBILI, S. et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59:365–378, 2009.

PADMAVATHI, R.; SENTHILNATHAN, P.; CHODON, D.; SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of paclitaxel end propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7, 12 dimethyl benz(á)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Life Sciences*. v.78, n.24, p.2820-2825, 2006.

PARRY, B. L. Jet lag: minimizing it's effects with critically timed bright hight and melatonin administration. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, Basel, v. 4, p. 463-466, 2002.

PERES, M. F. P.: A glândula pineal e sua função no homem. **Boletim Médico Espírita**, nº 10. Associação Médico Espírita de São Paulo, 1ª edição, 1996.

PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *International Journal of Cancer*, 97: 2002, p.72-81, 2002.

PRIEDKALNS, J. Sistema reprodutor feminino. In: Dellmann, H-D; Brown. *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap. 13, p. 254-277.

REIS, F. J. C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário – papel dos marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 222-227, 2005.

REITER, R.J.; SABRY, I.; NORDIO, M.; VAUGHAN, M.K.; MIGLIACCIO, S. Rate of reproductive involution following either exposure to short days or dialy administration of melatonin is faster in inbred than in randon-bred female Surian hamsters. **Journal of Endocrinology**. 1989 Mar;120(3):489-96.

REITER, R.J. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Europ J Endocrinol*, v. 134, p. 412-420, 1996.

REITER, R.J. et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol*, v. 50, n. 4, p. 1129-1146, 2003.

REITER, R.J. et al. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol*, v. 54, p. 1-9, 2007.

SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. et al. Melatonin and mammary cancer: a short review. **Endocrine-Related Cancer**, v. 10, p. 153-159, 2003.

SANTOS, J. A. **Patologia geral dos animais domésticos: mamíferos e aves**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1986. 409 p.

SILVA-FILHO, A.L. et al. Cirurgia não ginecológica em pacientes com câncer de ovário. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 411-416, Jun. 2004.

SILVA, J. A. G. da. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

SILMAN, R. E.; LEONE, R. M.; HOOPER, R. J. L. Melatonin, the pineal gland and human puberty. *Nature*, v. 282, p. 301-303, 1979.

SKENE, D.J.; ARENDT, J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem*, v. 43, p. 344-353, 2006.

SOARES JÚNIOR, J. M. et al. Influência da glândula pineal sobre a ingestão de água e NaCl em ratas normais e ooforectomizadas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 317-321, 1999.

STASICA, P. et al. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. **Journal Pineal Research**, Copenhagen, v. 25, p. 65-66, 1998.

SOFIC, E. et al. Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. *J Neural Transm*, v. 112, n. 3, 2005.

SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as 2. distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 40(18):2667-75, 2004.

SUMAYA, I.C.; MASANA, M.I.; DUBOCOVICH, M.L. The antidepressant-like effect of the melatonin receptor ligand luzindole in mice during forced swimming requires expression of MT2 but not MT1 melatonin receptors. *J Pineal Res*. 39(2):170-7, 2005.

TAKAMI, S. et al. Lack of modifying effects of prepubertal exposure to acrylamide (AA) on *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)-induced multi-organ carcinogenesis in F344 rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, Japan, v. 35, n. 1, p. 57-68, 2010.

TAMARKIN et al. Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patient with estrogen receptor positive breast cancer. *Science*, v. 216, p. 1003-1005, 1982.

TAND, D. X. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem*, v. 2, p. 181-197, 2002.

THIEBLOT, L.; BERTHELAY, J.; BLAIRE, S. Action de la melatonine sur la secretion gonadotrope du rat. **Société de Biologie**, Clermond-Ferrand, n. 160, p. 2306-2309, 1966.

THOMPSON, H. J.; SPORN, M. B. Mammary cancer in rats. In: TEICHER, B. A. **Tumor models in cancer research**. New Jersey: Humana Press, 2002. cap. 9, p.173-181.

TORRES, J.C.C.; DERCHAIN, S.F.M.; FAÚNDES, A.; GONTIJO, R.C.; MARTINEZ, E.Z.; ANDRADE, L.A.L.A. Risk-of-Malignancy Index in preoperative evaluation of clinically restricted ovarian cancer. *Sao Paulo Medical Journal*, v.120, p.72-6, May 2002.

UEZ, F. Cicatrização de feridas cutâneas e níveis séricos de corticosterona em ratos wistar submetidos ao enriquecimento ambiental. Dissertação de mestrado 2005. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias.

USUI, T.; MUTAI, M.; HISADA, S.; TAKOAKA, M.; SOPER, K.A.; McCULLOUGH, B.; ALDEN, C. CB6F1-rasH2 mouse: overview of available data. *Toxicology Pathology*, Lawrence, v.29, n.suppl. p.90-108, 2001.

WHITTEMORE, A. S. Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecologic Oncology*, New York, US, v. 55, p. 15-19, 1994.

YAMAMOTO, S.; URANO, K.; NOMURA, T. Validation of transgenic mice harboring the human prototype c-Ha-ras gene as a bioassay model for rapid carcinogenicity testing. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 102/103, p. 473-478, dec. 1998.

YOSHIZAWA, K.; KUMATA, M.; KAWANAKA, A.; UEHARA, N.; YURI, T.; TSUBURA, A. N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice is independent of the p53 gene. *Molecular Vision*, Atlanta Ga, v. 15, p.2919-2925, Dec. 2009.

ZANINI, M. et al. Carcinoma verrucoso: uma variante clínico-histopatológica do carcinoma espinocelular. **Anais brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, p. 619-621, set./out. 2004.

## **CAPÍTULO 2 - Pinealectomia em Ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) – Descrição de um novo método cirúrgico.**

**RESUMO** – A pineal é uma minúscula glândula endócrina que produz melatonina. Acredita-se que este derivado da serotonina exerça um efeito supressivo na secreção de gonadotrofinas, e por isso iniba o crescimento e a função das gônadas. Vários estudos têm avaliado a ação da pineal em animais experimentais submetidos pinealectomia sob diferentes protocolos anestésicos, instrumentais cirúrgicos e materiais de sutura. Neste estudo avaliou-se a padronização de um novo método cirúrgico para pinealectomia em Ratas Wistar a partir do tempo do ato operatório, acesso à pineal, cicatrização e risco de acidentes vasculares e neurológicos no período de evolução imediato e mediato. Trinta fêmeas nulíparas aos 90 dias de idade foram submetidas à anestesia dissociativa. Após a tricotomia e assepsia, realizou-se uma incisão na pele da linha média dorsal da cabeça. Procedeu-se a craniectomia com um micromotor e broca de aço PM 03 a partir do osso parietal direito, parietal esquerdo, e o osso occipital formando uma janela que permitiu a visibilização dos seios venosos, transfixado com fio de sutura 5-0 ABS Poliglactina montado em agulha e seccionado para acesso à pineal que foi removida por intermédio de um Fórceps Cápsula Arruga. O fragmento ósseo inserido sem fixação e a pele suturada por pontos simples com fio 5-0 ABS Poliglactina. O tempo médio de 20 minutos do ato cirúrgico transcorreu sem sangramentos e episódios neurológicos evidentes, o acompanhamento diário evidenciou padrão de cicatrização por primeira intenção da ferida operatória e sinais clínicos dentro do padrão fisiológico. Conclui-se que os aprimoramentos da técnica cirúrgica de pinealectomia são aplicáveis em Ratas Wistar.

**Palavras-chave:** Pineal, Cirurgia, Inovação.

**Pinelectomy in Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) – Description of a new surgical method.**

**ABSTRACT** - The pineal gland is a tiny endocrine gland that produces melatonin. It is believed that this derivative of serotonin exerts a suppressive effect on gonadotropin secretion and therefore inhibits the growth and function of the gonads. Several studies have evaluated the action of the pineal, pinealectomy in experimental animals submitted under different anesthetic protocols, surgical instruments and suture materials. In this study we evaluated the standardization of a new surgical method to pinealectomy in Wistar Rats from the time of the surgery, access to the pineal, scarring and risk of vascular and neurological injuries the period of evolution immediate and mediate. Thirty nulliparous at 90 days old female underwent dissociative anesthesia. After trichotomy and asepsis, made an incision in the skin of the dorsal midline of the head. There has been craniectomy with a micromotor drill steel and PM 03 from the right parietal bone, left parietal, and occipital bone forming a window that allowed visualization of the venous sinuses, transfixed with 5-0 suture needle mounted on ABS Poliglactina and sectioned to access pineal that was removed by Forceps Arruga Capsule. The bone fragment inserted without fixation and skin sutured by simple points thread ABS Poliglactina 5-0. The average time of 20 minutes from the surgery proceeded without evident bleeding and neurological episodes, the daily monitoring showed by first intention healing surgical wound and clinical signs in the physiological standard. It is concluded that the improvements in the surgical technique of pinealectomy are applicable in Wistar Rats.

**Keywords:** Pineal, Surgery, Innovation.

## 1 INTRODUÇÃO

A pineal é uma minúscula glândula endócrina que produz melatonina. Acredita-se que este derivado da serotonina exerça um efeito supressivo na secreção de gonadotrofinas, e por isso iniba o crescimento e a função das gônadas. Tem despertado o interesse de pesquisadores sob os mais diversos aspectos. Vários estudos têm avaliado a ação da pineal em animais experimentais submetidos pinealectomia sob diferentes protocolos anestésicos, instrumentais cirúrgicos e materiais de sutura. Os dados sobre ações da pineal sob o organismo são inúmeros, no entanto no que diz respeito ao procedimento cirúrgico ainda são escassos. Sendo assim existe a necessidade de incrementar os procedimentos cirúrgicos na pinealectomia como alternativa de manter a fisiologia vascular e neurológica, evitar injúrias e morte do animal.

Anatomicamente a glândula pineal tem a forma de um cone de pinha sendo um órgão parenquimatoso, derivado do teto diencefálico caudal que se projeta posteriormente no tronco cerebral (PERES, 1996). A glândula pineal localiza-se abaixo do corpo caloso e diferentemente das outras glândulas é controlada pelo núcleo supraquiasmático situado no hipotálamo, considerado o principal relógio biológico dos mamíferos (REITER *et al.*, 1989).

De origem neuroectodérmica, este pequeno apêndice encefálico mediano é uma minúscula glândula endócrina que produz a melatonina. Acredita-se que este derivado da serotonina ou de algum mediador relacionado, semelhante a um hormônio, exerça um efeito supressivo na secreção de gonadotrofinas, e por isso iniba o crescimento e a função das gônadas (CORMACK, 2008).

Andersen & Wolf (1934) além de realizem experimentos com ratos pinealectomizados, descreveram um estudo crítico da literatura com os primeiros estudos do procedimento cirúrgico em cachorro, ratos, cobais, coelho, pintinho e sapo, desde a primeira década do século passado.

Com o desenvolvimento das pesquisas envolvendo a glândula pineal procedimentos cirúrgicos vem sendo realizados (Tabela 1). É de se reconhecer na maioria dos casos o problema da rápida hemorragia de forma fatal envolvendo os seios da dura-máter. A técnica ideal para remoção da pineal deve-se no estancamento do sangramento, na curta duração da cirurgia, na apresentação de uma visão clara da glândula pineal no local da operação facilitando a sua extirpação e diminuindo a probabilidade de danos acidentais nas estruturas neurais adjacentes (KUSZAK & RODIN, 1977).

**Tabela 1** - Histórico dos principais autores que descreveram técnicas de pinealectomia de 1934 a 2009

AUTOR	ANO	NÚMERO DE ANIMAIS	CRANIOTOMIA	BROCA	PINEALECTOMIA	FIOS PARA OS SEIOS VENOSOS	FIOS PARA A PELE
ANDERSEN E WOLF	1934	125	quadrado	lanceta	Pinça	Não ligou	sem descrição
DAS GUPTA E TERZ	1967	114	quadrado	circular	pinça de relojoeiro	7-0 seda	catgut cromado 4-0
KUSZAK E RODIN	1977	200	retangular	broca nº 05	pinça de relojoeiro e estereotáxico D. KOPF, TUJUNGA, CA	fio cirúrgico 6-0	clipes de ferida MICHEL
EVÊNCIO-NETO	1998	36	circular	tronco cônica	lupa e pinça de relojoeiro	catgut 5-0	polipropileno 3-0
SOARES JÚNIOR et al.	1999	20	sem descrição	circular	pinça apropriada e estereotáxico	sem descrição	sem descrição
MAGANHIN et al.	2009	80	circular	sem descrição	lupa e pinça curva	catgut simples 5-0	polipropileno 3-0

Este trabalho propõe a padronização de uma nova técnica, a partir a padronização de um novo método cirúrgico para pinealectomia em Ratas Wistar a partir do tempo do ato operatório, acesso à pineal, cicatrização e risco de acidentes vasculares e neurológicos no período de evolução imediato e mediato com aplicabilidade de instrumento cirúrgico adaptado e fio absorvível ABSPoliglactina (PGLA).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

É conhecido que as Ratas Wistar convivem em grupos num ambiente biológico e são utilizados como animais de experimentação, para tanto os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE (Licença Nº 026/2012). As 30 Ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) nulíparas aos 90 dias de idade, adultas-jovens, passíveis de um procedimento cirúrgico. Pesando em média 227g foram provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sendo realizada as intervenções cirúrgicas e observações pelo período de 01 de maio a 30 de setembro de 2012. Foram operadas e avaliadas clinicamente nos primeiros 30 dias pós-operatório.

Distribuídas aleatoriamente em cinco grupos constituído por seis animais, cada grupo acondicionado em gaiolas de policarbonato com tampa gradeada de metal e forradas com maravalha de pinus. As Ratas Wistar foram expostas a fotoperíodo de 12 horas de luz artificial produzida por lâmpadas fluorescentes, e por 12 horas de escuridão, com acesso a água e ração, *ad libitum*. Com a temperatura e a umidade do ambiente controlada (HARKNESS & WAGNER, 1993).

Clinicamente sadias submetidas à anestesia dissociativa com 75mg/kg de cloridrato de cetamina<sup>1</sup> associada a 10mg/kg cloridrato de xilazina<sup>2</sup> a 2% por via intramuscular com respiração espontânea. Posicionadas em decúbito ventral sob cama cirúrgica adaptada com seus membros em extensão.

---

1.VETANARCOL – König, Santana de Parnaíba – SP.

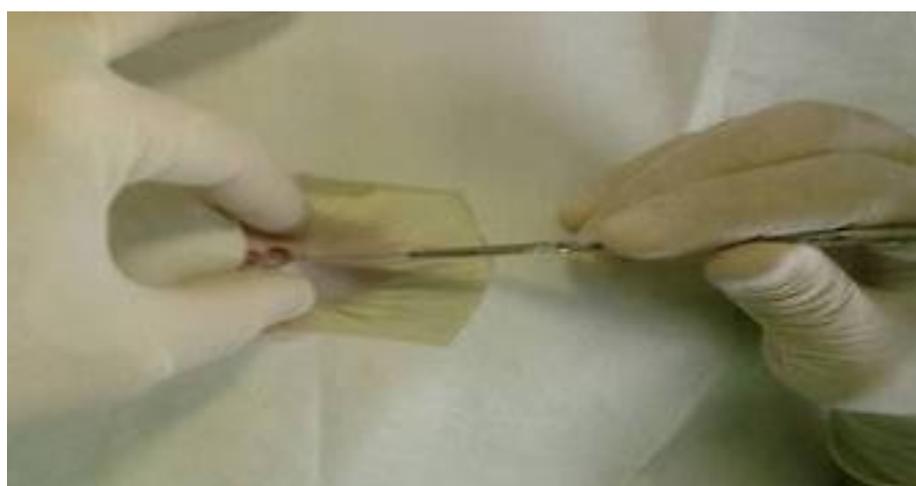
2.ANASEDAN – CEVA Saúde Animal, Paulínia – SP.

Procedeu-se na área dorsal da cabeça a tricotomia com lâmina de aço inoxidável e a anti-sepsia com digluconato de clorexidina<sup>3</sup> a 2% e solução fisiológica de cloreto de sódio<sup>4</sup> a 0,9% (Figura 4).



**Figura 4** - Fotografia mostrando a Rata Wistar em decúbito ventral evidenciando a área cirúrgica após tricotomia e anti-sepsia

Colocado os campos cirúrgicos, limitando a área operatória realizou-se na pele, com bisturi nº04 e lâmina nº22, uma incisão de 2cm na linha média dorsal desde a região interorbitária até a interauricular (Figura 5). A pele rebatida, e assim mantida.



**Figura 5** - Fotografia demonstrando a realização da incisão na pele com o bisturi na linha média dorsal da cabeça desde a região interorbitária até a

---

3.HANDEX – Saneativo Laboratório Farmacêutico Ltda, Gama - DF

4.FISIOLOGICO 0,9% - Áster Produtos Médicos, Sorocaba SP

Com um micromotor (Motor de Suspensão Beltec Mini) de baixa rotação (RPM 15.000) e uma broca odontológica de aço PM 03 acoplada a um mandril, realizou-se a craniotomia (Figura 6). Retirou-se um fragmento circular da calota de aproximadamente 4mm de diâmetro, tendo como ponto central de referência o lambda, ou seja, a união da sutura sagital com a sutura lambdóidea. Iniciou-se o procedimento na região cranial direita no osso parietal, passando para o lado esquerdo, procedeu-se a incisão do osso parietal, e na região mais caudal o osso occipital. Assim diminui os riscos de lesões encefálicas, pois o osso occipital apresenta maior resistência e localiza-se numa região de difícil acesso.

As suturas cranianas foram seccionadas sempre após todos os ossos craniais, em virtude da grande vascularização no local, o que dificulta a visualização da área cirúrgica e aumenta o risco de morte. Após a retirada do fragmento ósseo, e mantido em recipiente contendo solução fisiológica de cloreto de sódio<sup>4</sup> a 0,9% a temperatura ambiente.



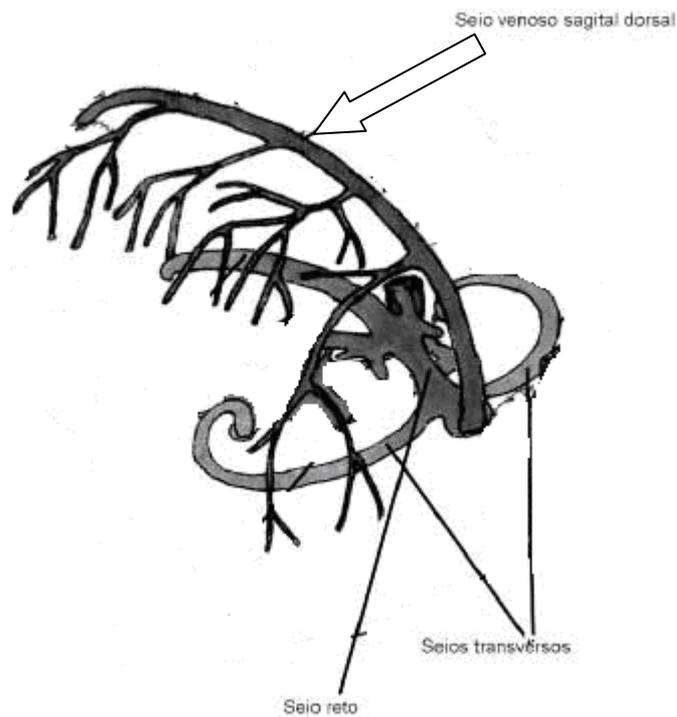
**Figura 6** - Fotografia demonstrando a craniotomia com auxílio do micromotor de baixa rotação e broca de aço PM 03.

Tendo a visualização da junção dos seios venosos - sagital dorsal e transversos em forma de Y (Figura 7 e 8) - dois fios de sutura 5-0 ABS Poliglactina montados em agulha

foram transfixados, um próximo à confluência dos seios e o outro mais afastado deste ponto, de modo que uma vez tracionados, se obteve a ligadura do seio venoso sagital dorsal (Figura 9).



**Figura 7** - Fotografia evidenciando o seio venoso sagital dorsal e os transversos em forma de Y. (seta).



**Figura 8** - Desenho esquemático mostrando os seios venosos. Destaque para o seio venoso sagital dorsal (seta).



**Figura 9** - Fotografia mostrando a ligadura dos seios venosos (seta).

Usando uma tesoura cirúrgica Metzenbaum reta romba 12cm (Figura 10), apropriada para tecidos moles, procedeu-se uma secção do vaso entre os dois nós, o nó próximo à confluência foi flexionado para visualização e pinealectomia por intermédio de um Fórceps Cápsula Arruga de 9,5cm (Figura 11), a pineal fixada em glutaraldeído para confirmação histológica.



**Figura 10** - Fotografia mostrando tesoura cirúrgica reta romba 12cm utilizada no procedimento cirúrgico.



**Figura 11** - Fotografia mostrando o Fórceps Cápsula Arruga empregado na pinealectomia.

A hemostasia em leito feita por compressão digital com algodão odontológico umedecido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. O fragmento ósseo inserido sem fixação e recoberto com pele suturada em pontos simples com fio 5-0 ABS Poliglactina (Figura 12).



**Figura 12** - Fotografia demonstrando pele suturada em pontos simples com fio 5-0 ABS Poliglactina.

Como medida de prevenção de infecção pós-cirúrgica administrou-se uma única dose de 10mg/kg por via subcutânea de sulfa + trimetopim<sup>5</sup>. Como reposição hidroeletrólítica imediata administrou-se 2 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio<sup>4</sup> a 0,9% subcutâneo para cada Rata Wistar. Mantidas por 20 minutos em manta térmica, recolocadas em gaiolas higienizadas (Figura 13).

Permaneceram em observação no período de recuperação anestésica, avaliadas pelo retorno dos reflexos abolidos e pela movimentação ativa e/ou estimulada (Figura 14). Examinadas diariamente nos primeiros 30 dias pós- operatório

---

5.DIMETOPRIM – Hertape Calier, Juatuba - MG



**Figura 13** - Fotografia mostrando Rata Wistar envolvida por uma manta térmica no período imediato pós-cirúrgico.



**Figura 14** - Fotografia mostrando as Ratas Wistar em movimentação após a recuperação anestésica.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo médio de 20 minutos do ato cirúrgico transcorreu sem sangramentos e episódios neurológicos evidentes. O exame clínico diário dos animais não evidenciou nenhum comprometimento da ferida operatória com padrão de cicatrização por primeira intenção e os animais apresentaram normalidade de atos fisiológicos como alimentação, defecação e micção, assim como socialização com o grupo. Os achados mostraram que, de modo indireto, o ato operatório não afetou o bem-estar e o estado geral das Ratas Wistar. A padronização de um novo procedimento cirúrgico para a pinealectomia foi eficaz no que se refere à ausência de óbitos durante o procedimento (Tabela 2).

As Ratas Wistar utilizadas apresentaram fácil manipulação, dóceis, recuperação rápida do efeito do anestésico e sedação, além de se ter uma amostra homogênea. Por outro lado Massone (1994b) destacou que na escolha do animal a ser empregado em experimentação é necessária que se leve em consideração a praticidade de manipulação, tipo de ensaio biológico e o custo operacional.

**Tabela 2** - Relação entre animais operados e número de óbitos observados no período de 01 de maio a 30 de setembro de 2012

Animais	Número
Operados	30 (100%)
Vivos	30 (100%)
Óbitos	0 (0%)

No tocante ao procedimento anestésico empregado onde as Ratas Wistar foram submetidas à anestesia dissociativa nos permitiu realizar convenientemente todas as manobras cirúrgicas e as Ratas Wistar apresentaram boa recuperação anestésica. Assim como Massone (1994b) descreveu os resultados na anestesia em ratos a partir das associações anestésicas entre um agente dissociativo e uma droga de ação miorelaxante, analgésica e sedativa, características de neuroleptoanalgesia. Massone (1994a) acrescentou que esta associação tem

se consagrado devido à praticidade, pois efetua-se a anestesia com dose única por via intramuscular, além do que há permanência dos reflexos protetores presentes e o período anestésico é hábil.

Para a assepsia da área operada utilizamos digluconato de clorexidina a 2% e solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, que minimizaram os riscos de meningite bacteriana. Não utilizamos o aparelho estereotáxico para proceder à pinealectomia por entendermos que podem ocorrer traumatismos, no entanto Kuszak & Rodin (1977) e Soares Júnior *et al.* (1999) utilizaram em seus procedimentos.

Realizamos a craniotomia sem raspagem prévia do periósteo, em virtude das suas funções na consolidação óssea (CORMACK, 2008) tal procedimento foi descartado diferente de Kuszak & Rodin (1977) e Evêncio-Neto (1998) que após o afastamento da pele realizaram a raspagem do periósteo em seus experimentos.

Por possuir menor diâmetro a broca esférica de aço PM 03 acoplada a um mandril não interferiu no encéfalo promovendo a craniotomia sem lesões neurológicas evidentes. Estudo realizado por Evêncio-Neto (1998) utilizou broca cônica, Das Gupta & Terz (1967) e Soares Júnior *et al.* (1999) uma broca circular.

Padronizamos a forma circular com aproximadamente 4mm de diâmetro para o fragmento da calota craniana, também Evêncio-Neto (1998) e Maganhin *et al.* (2009), diferente de Kuszak & Rodin (1977), que uniformizaram a incisão retangular, Andersen & Wolf (1934) e Das Gupta & Terz (1967) procederam de forma quadrangular.

Acondicionamos o fragmento ósseo em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% em imersão por um período de cinco minutos permitiu manter os tecidos hidratados, Evêncio-Neto (1998) empregou algodão umedecido em solução salina a 0,9% em contato com o fragmento.

O fio não absorvível pode agir como corpo estranho dificultando a cicatrização e provocando alterações dolorosas na área cirúrgica além de lesões encefálicas, prejudicando o estado geral do animal, por isso na ligadura dos seios venosos utilizamos o fio absorvível ABS Poliglactina com ausência de reações tipo corpo estranho ou de eliminação, no entanto Evêncio-Neto (1998) e Maganhin *et al.* (2009) utilizaram catgut 5-0 simples, Kuszak & Rodin (1977) fio cirúrgico 6-0 e Das Gupta & Terz (1967) fio de seda 7-0. Andersen e Wolf (1934) não ligaram os seios venosos, provavelmente devido à idade dos animais utilizados em seu experimento, pois se tratou de ratas com 1-3 dias de idade.

Empregamos a tesoura cirúrgica reta romba para secção do seio venoso sagital dorsal, sem a necessidade da tesoura de íris como Evêncio-Neto (1998).

A pinça de relojoeiro utilizada por Das Gupta & Terz (1967), Kuszak & Rodin (1977) e Evêncio-Neto (1998) substituída em nosso método cirúrgico pelo Fórceps Cápsula Arruga, onde a pineal ficou acoplada na cavidade e removida por tensão direta e rápida sem produzir alterações encefálicas e sem a necessidade da lupa estereoscópica como em Evêncio-Neto (1998) e Maganhin *et al.* (2009), e de um estereotáxico como utilizado por Kuszak & Rodin (1977) e Soares Júnior *et al.* (1999).

A técnica executada com pontos simples na sutura da pele com ABS Poliglactina 5-0 não apresentaram tensão tecidual, outros autores não citaram estes aspectos com o Catgut cromado 4-0 aplicado em 1967 por Das Gupta & Terz, Evêncio-Neto (1998) e Maganhin *et al.* (2009) com o polipropileno 3-0 e Kuszak & Rodin (1977) com clipes de feridas 11 mm Michel.

Em virtude do tamanho da área operatória e por se tratar de uma região altamente sensível optou-se por realizar a hemostasia em leito com algodão odontológico, umedecido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, que é extremamente absorvível e possui

uma proteção externa que impede a perda de fios, em contra partida o uso de gaze umedecida foi descrito por Evêncio-Neto (1998).

Para profilaxia contra infecções administramos em Ratas Wistar sulfa + trimetoprim em dose única no pós-operatório imediato pelo seu amplo espectro de ação, Soares Júnior *et al.* (1999) e Maganhin *et al.* (2009) realizaram a profilaxia com Pentabiótico.

#### **4 CONCLUSÕES**

O presente estudo ao longo do desenvolvimento experimental permite concluir que os aprimoramentos da técnica cirúrgica de pinealectomia com as manobras efetuadas transcorreram sem sangramentos graves e episódios neurológicos evidentes, com cicatrização da ferida operatória por primeira intenção e sinais clínicos dentro do padrão fisiológico. Tornando o procedimento rápido e exímio na pesquisa científica da pinealectomia em Ratas Wistar.

## REFERÊNCIAS

ANDERSEN, D. H.; WOLF, A. Pinealectomy in rats with a critical survey of the literature. **Journal of Physiology**. 1934 Mar 29;81(1):49–62.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de Histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 371p.

DAS GUPTA, T. K.; TERZ, J. Influence of pineal gland on the growth and spread of melanoma in the hamster. **American Association for Cancer Research**. 1967; 27: 1306-1311.

EVENCIO-NETO, J. Efeito da melatonina na adrenal de ratas pinealectomizadas. Tese de doutorado 1998. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatório e Cirurgia Experimental.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Biologia e Manejo. In: \_\_\_\_\_. 3 ed. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. São Paulo: Roca, 1993. cap. 2. p. 9-55.

KUSZAK, J.; RODIN, M. A new technique of pinealectomy for adult rats. **Experientia**, Basel, 1977, v.33, p.283-4.

MASSONE, F. Neuroleptoanalgesia e anesthesia dissociativa. In: \_\_\_\_\_. 2 ed. **Anestesia Veterinária – Farmacologia e Técnicas**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1994. cap. 8. p. 92-97. a

MASSONE, F. Técnicas anestésicas de Laboratório. In: \_\_\_\_\_. 2 ed. **Anestesia Veterinária – Farmacologia e Técnicas**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1994. cap. 10. p. 105-110. b

MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; SIMÕES, M. J.; EVÊNCIO-NETO, J.; BARACAT, E. C.; SOARES, J. M. Rat pinealectomy.

A modified direct visual approach. **Acta Cirúrgica Brasileira**. Periódico na internet. 2009. julho-agosto; 24 (4).

PERES, M. F. P.: A glândula pineal e sua função no homem. **Boletim Médico Espírita**, 1996, nº 10. Associação Médico Espírita de São Paulo, 1ª edição.

REITER, R.J.; SABRY, I.; NORDIO, M.; VAUGHAN, M.K.; MIGLIACCIO, S. Rate of reproductive involution following either exposure to short days or dialy administration of melatonin is faster in inbred than in randon-bred female Surian hamsters. **Journal of Endocrinology**. 1989 Mar;120(3):489-96.

SOARES JÚNIOR, J. M.; BARACAT, E.C.; OLIVEIRA, S.; HAIDAR, M. A.; SIMÕES, M. J.; REIS, L. C. Influência da glândula pineal sobre a ingestão de água e NaCl em ratas normais e ooforectomizadas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 1999. v. 21, n. 6, p. 317-321.

**CAPÍTULO 3** – Estudo experimental de Ratas Wistar submetidas à pinealectomia e N-Nitroso-Methylurea associados ou como agentes únicos.

**RESUMO** – O N-Nitroso-N-Methylurea (NMU) tem ação cancerígena direta, induzindo tumores em várias espécies em diversos órgãos. Objetivou-se estabelecer um modelo experimental para indução de tumores nos ovários de 36 Ratas Wistar, em 6 grupos, subdivididas de acordo com a idade. Pinealectomizadas e não pinealectomizadas, e NMU associados ou como agentes únicos. Foram submetidas à pinealectomia aos 90 dias de idade e evoluíram bem no pós-operatório. Observamos após a aplicação do NMU, clinicamente que as Ratas Wistar submetidas a 100mg apresentaram um ganho de peso inferior aos outros grupos, podendo está relacionada à presença da pineal com a dose administrada. Por imagem tomográfica, com ênfase na região dos ovários, não foram diagnosticadas lesões no organismo animal. Na análise histopatológica por H.E. dos ovários identificou-se normalidade nas estruturas teciduais nas camadas cortical e medular, angiogênese, desenvolvimento folicular em vários estágios de maturação, corpos lúteos e depósito de hemossiderina. Mediante os resultados obtidos, o modelo experimental de carcinogênese ovariana em Ratas Wistar, utilizando o NMU intraperitoneal associado ou não à pinealectomia mostrou inviabilidade prática neste estudo, devido a ausência de tumores.

**Palavras-chave:** câncer, indutor, fêmeas.

Experimental study of Wistar rats subjected to pinealectomy and N-Nitroso-associated Methylurea or as single agents.

**ABSTRACT** – The N-Nitroso-N-Methylurea (NMU) has direct carcinogenic action , inducing tumors in various organs in various species. Objective was to establish an experimental model for induction of tumors in the ovaries of 36 Wistar rats into 6 groups, subdivided according to age. Pinealectomizadas not pinealectomizadas and NMU members or as single agents. Underwent pinealectomy at 90 days of age and progressed well postoperatively. Observed after application of NMU, clinically the Wistar rats subjected to 100mg showed a weight gain less than the other groups, may is related to the presence of the pineal to the administered dose. For tomographic imaging, with emphasis on the region of the ovaries, were undiagnosed lesions in the animal organism. Histologically by H.E. ovaries were identified in normal tissue structures in the cortical and medullary layers, angiogenesis, follicle development at various stages of maturation, corpora lutea and hemosiderin deposits. From the results obtained, the experimental model of ovarian carcinogenesis in Wistar rats, using with or without pinealectomy intraperitoneal NMU showed practical impossibility in this study due to the absence of tumors.

**Keywords:** cancer, inductor, females

## 1 INTRODUÇÃO

A taxa de mortalidade por câncer nos últimos anos vem crescendo em função do crescimento populacional, processo de industrialização e mudanças nos hábitos de vida. Sendo assim, o câncer é considerado um problema de saúde pública e, esforços devem ser mobilizados para sua prevenção e cura (KAPIL *et al.*, 2004)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 10 milhões de casos de câncer surgem a cada ano, causando mais de 6 milhões de óbitos, sendo a terceira causa de morte no Brasil. As estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e aponta a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon, reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon, reto e glândula tireóide para o sexo feminino (INCA, 2011).

As causas primárias ainda não estão muito bem esclarecidas, mas as neoplasias surgem devido às mutações genéticas espontâneas ou induzidas provenientes da exposição do organismo a vários fatores carcinogênicos, sendo esta ação classificada em três categorias, a carcinogênese biológica, a física e a química (BARBOSA, 2006), provocando desordem no ciclo celular, ocorrendo excesso na taxa de proliferação e deficiência nas taxas de morte celular. Este processo culmina com a formação de agrupamentos de clones de células neoplásicas, isto é, tumores (FERRARI & TORRES, 2002).

O câncer de ovário é o tumor ginecológico mais difícil de ser diagnosticado e o de menor chance de cura. Cerca de 3/4 dos cânceres desse órgão apresentam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico. É a neoplasia ginecológica mais letal. Menos da metade (43%) das mulheres sobrevivem por mais de cinco anos após o diagnóstico de câncer de ovário. A maioria dos tumores de ovário são carcinomas epiteliais, ou seja, câncer que se

inicia nas células da superfície do órgão ou tumor maligno de células germinativas (INCA, 2012).

A maioria dos tumores induzidos por 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) são benignos, e devem ser classificados como fibroadenomas (McCORMICK & MOON, 1965). Além disso, não fazem metástase, com as limitações com o uso do modelo de DMBA conduziu a uma procura para um carcinógeno mamário mais efetivo que induzisse tumores que são quase exclusivamente carcinomas. Em 1975, esta procura culminou com a introdução do *N-Nitroso-N-methylurea* (NMU) como indutor de tumor mamário (GIULLINO, PETTIGREW & GRANTHAM, 1975).

Considerando o potencial cancerígeno do NMU, o presente trabalho propõe a caracterização clínica e histológica de seus efeitos sobre as células ovarianas de Ratas Wistar pinealectomizadas e não pinealectomizadas submetidas a doses variadas deste carcinógeno em diferentes idades, tendo em vista a análise do modelo experimental para posteriores estudos de agentes potencialmente ativos para o tratamento do câncer.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e Condições de Alojamento

Todos os procedimentos experimentais envolvendo a utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE (Licença Nº 026/2012).

As Ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) nulíparas aos 90 dias de idade, adultas-jovens, passíveis de suportar um procedimento cirúrgico. Pesando aproximadamente 227g foram provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sendo realizado as intervenções cirúrgicas e observações pelo período de 01 de maio a 30 de setembro de 2012. Todos os animais foram operados e avaliados clinicamente nos 30 dias pós-cirúrgico.

Distribuídas aleatoriamente em grupos formados por seis animais, no qual cada grupo foi acondicionado em gaiolas de policarbonato com tampa gradeada de metal e forradas com maravalha de pinus.

- Grupo I – Ratas pinealectomizadas aos três meses de idade (n=6)
- Grupo II – Ratas pinealectomizadas aos três meses de idade e após 30 e 60 dias submetidas à indução tumoral (NMU) (n=6)
- Grupo III – Ratas induzidas com o NMU aos quatro e cinco meses de idade (n=6)
- Grupo IV – Ratas pinealectomizadas aos três meses de idade e após 30 dias submetidas à indução tumoral (NMU) (n=6)
- Grupo V – Ratas induzidas com o NMU aos 30 dias de idade (n=6)
- Grupo VI – Controle (n=6)

As Ratas Wistar foram expostas a fotoperíodo de 12 horas de luz artificial produzida por lâmpadas fluorescentes, e por 12 horas de escuridão, com acesso a água e ração, *ad*

*libitum*. Com a temperatura e a umidade do ambiente controlada (HARKNESS & WAGNER, 1993).

### **Indução química tumoral**

As Ratas Wistar dos grupos I, II e IV aos 90 dias de idade foram submetidas à pinealectomia. Após 30 dias de observações diárias administrou-se o NMU<sup>1</sup>, de acordo com cada grupo. A partir da diluição em 3 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) de 2g de NMU foi obtida uma solução de concentração igual a 0,6mg/μL, armazenada em eppendorfs contendo alíquotas de 100μL. Para cada animal foram calculadas as doses da solução estoque do NMU completando com tampão PBS para uma solução final de 1 ml.

Como medida de segurança equipamentos de proteção individual foram usados durante todo procedimento de manipulação com o agente indutor tumoral. Assim como para o descarte dos utensílios, confeccionado um tambor de 100L com camadas de 10cm de materiais diferentes onde uma camada de argila isolou o fundo do tambor, acima uma camada de pó de serra para absorção das substâncias na forma líquida e carvão vegetal para absorção das voláteis (Figura 15).

### **Estudos Clínicos**

Durante os primeiros 30 dias pós-operatório, examinadas clinicamente quanto ao seu estado geral e cicatrização da ferida cirúrgica. A partir da administração do NMU cada animal foi pesado duas vezes por semana para uma análise ponderal do ganho de peso.

---

1. SIGMA-ALDRICH, EUA.



**Figura 15** – **A:** Fotografia do tambor utilizado para descarte dos produtos e utensílios após a indução química. **B:** Camada de argila no fundo do tambor. **C:** Pó de serra adicionado acima da argila. **D:** Carvão vegetal na camada mais superficial.

## Tomografia Computadorizada

Após serem transportados para uma Clínica Veterinária Especializada (FOCCUS – Recife- PE) os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de cetamina<sup>2</sup> (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina<sup>3</sup> (10 mg/kg) por via intramuscular e submetidos ao exame tomográfico posicionados em decúbito ventral e organizados por grupos enfileirados sob a mesa do tomógrafo. Inicialmente o corpo do animal foi exposto a emissão de feixes de raios-X, em seguida houve a coleta de imagens sequenciais em “fatias” de todo corpo do animal. Os exames de tomografia computadorizada foram obtidos a partir do aparelho GE Hi-speed FXI.

---

2.VETANARCOL – König, Santana de Parnaíba – SP.

3.ANASEDAN – CEVA Saúde Animal, Paulínia – SP.

## **Estudo Histopatológico**

Aos 11 meses de idade as Ratas Wistar foram eutanasiadas por indução à parada cardio-respiratória com 20mg/kg de cloridrato xilazina<sup>3</sup> a 2% por via intramuscular associada a uma máscara com algodão úmido em isoflurano<sup>4</sup>. De todos os animais foram coletados os ovários, sendo acondicionados em solução de formol tamponado a 10% por 48hs e destinados à confecção de lâminas histológicas. Os fragmentos foram submetidos à clivagem, sendo em seguida processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 5µm e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.) segundo metodologia descrita por Behmer, Tolosa & Freitas Neto, (1976). As análises das lâminas foram realizadas em microscópio óptico.

Todo processamento para microscopia óptica foi realizado nos Laboratórios de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e do Laboratório de Histologia Departamento de Medicina a Veterinária, ambos da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

## **Análise Estatística**

Realizou-se um estudo descritivo que tem como fundamento descrever o perfil dos parâmetros observados. Os resultados obtidos no histopatológico foram analisados pelo teste de *G* com Correção de Williams.

---

4. ISOFORINE – Cristália, Itapira - SP.

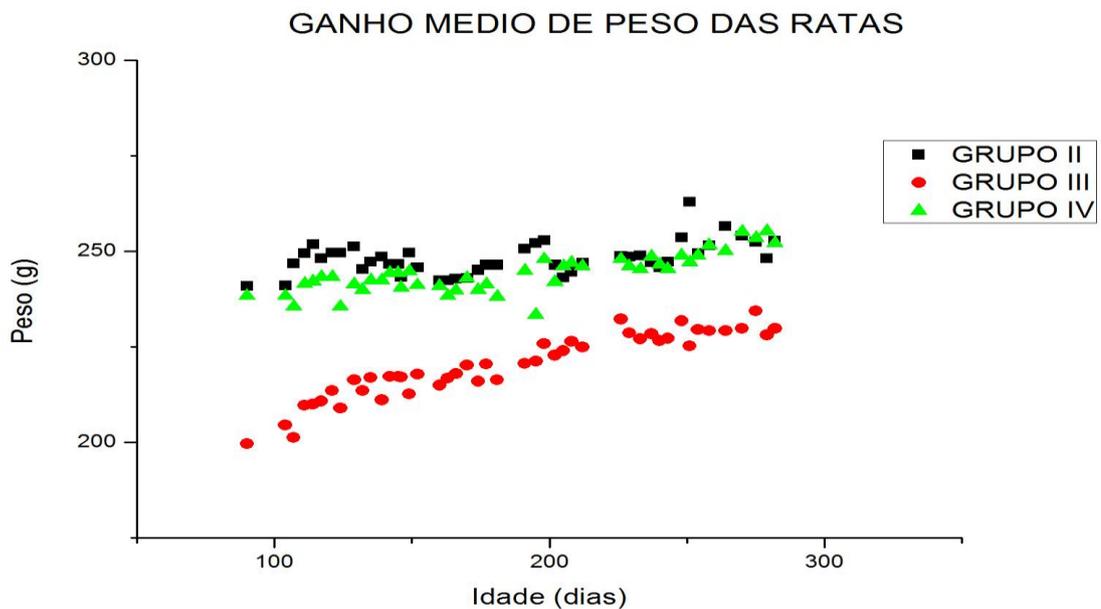
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização de um novo procedimento cirúrgico para a pinealectomia foi eficaz no que se refere à ausência de óbitos durante o procedimento da pinealectomia. As Ratas Wistar, foram de fácil manipulação, dóceis, apresentaram recuperação rápida do efeito dos anestésicos, além de ser um animal de fácil disponibilidade, sendo possível a aquisição de uma amostra muito homogênea através do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, considerando-se estudos de Massone (1994), quando afirmou que a escolha do animal a ser empregado em experimentação científica é importante, pois é necessário que se leve em consideração a praticidade de manipulação, tipo de ensaio biológico e o custo operacional.

O comportamento do quadro clínico-cirúrgico dos animais não evidenciou nenhum comprometimento da ferida operatória com padrão de cicatrização por primeira intenção. O quadro clínico se manteve e os animais apresentaram normalidade de atos fisiológicos como alimentação, defecação e micção, assim como socialização com o grupo. Os achados mostraram que, de modo indireto, o ato operatório não afetou o estado geral dos animais.

Conseguimos confirmar que a diluição do NMU em Dimetilsulfóxido (DMSO), e para cada animal calculadas as doses da solução estoque completando com tampão PBS não desenvolveram tumores no organismo animal. Tarso *et al.* (2011) diluiu o NMU em DMSO, por via oral, no entanto o modelo experimental não mostrou viabilidade prática para carcinogênese gástrica. Anisimov (1988) sintetizou o NMU a uma pureza de 99% e dissolveu em citrato contendo 0,8% de NaCl, administrou via endovenosa em Ratas com três meses de idade e 15 meses de idade, obteve tumores ovarianos benignos e malignos com maior incidência nos animais jovens.

Na figura 16 é possível ver o ganho médio de peso dos animais do grupo II (241g-248,83g), III (202g-230g) e IV (238,4g-248). Observa-se que as Ratas Wistar do grupo III tiveram um ganho de peso inferior aos demais grupos a partir da administração do NMU, podendo a presença da pineal (SOARES JÚNIOR, 1999) associada as 100mg administrada terem influenciado nestes resultados. Em Tarso *et al.* (2011) o peso médio inicial foi de 346, com ganho de peso corporal por semana menor no ratos que desenvolveram câncer.

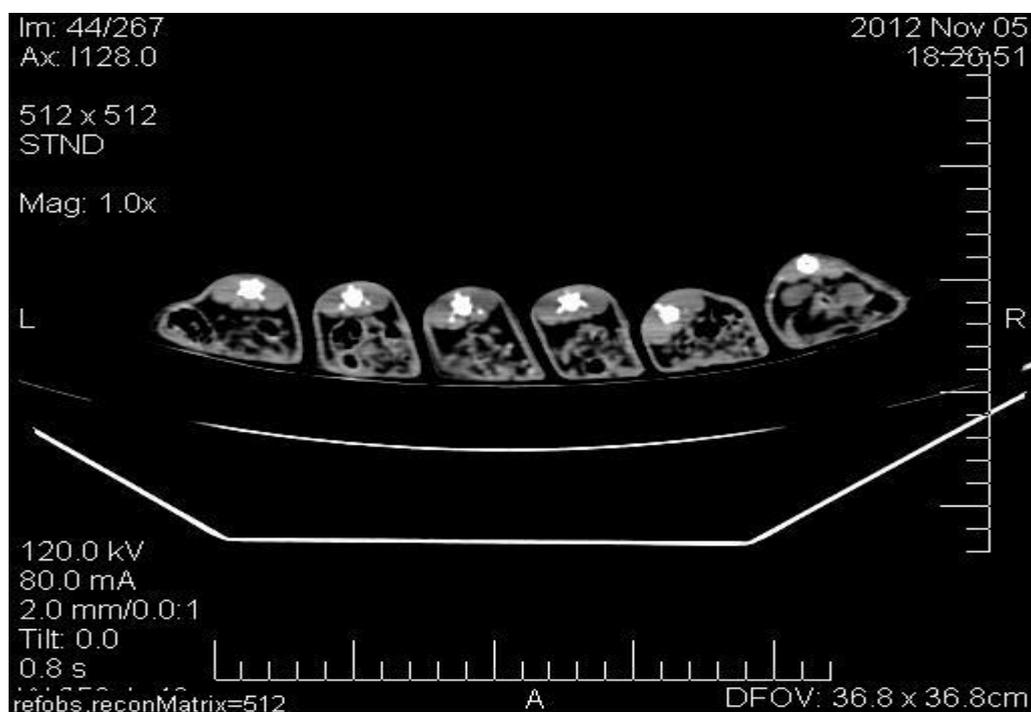


**Figura 16** – Ganho médio de peso das Ratas Wistar do grupo II, III e IV.

Em virtude das características anatômicas e topográficas dos ovários o diagnóstico por imagem de neoplasia muitas vezes acontece em estágios avançados da doença, o que reflete diretamente no prognóstico. Por imagem tomográfica, com ênfase na região dos ovários, não foram diagnosticadas lesões no organismo animal (Figura 17 e 18). A tomografia computadorizada auxilia nas linhas de pesquisa levando tanto ao conhecimento da anatomia quanto à doença, possibilitando um diagnóstico mais preciso e um tratamento mais adequado (PAULUS *et al.*, 2000).



**Figura 17** – Imagem tomográfica da cavidade torácica, ausência de massa tumoral. Visualização de costelas, coluna vertebral, coração e pulmão.



**Figura 18** – Imagem tomográfica da cavidade abdominal, ausência de massa tumoral. Visualização de alças intestinais e coluna vertebral.

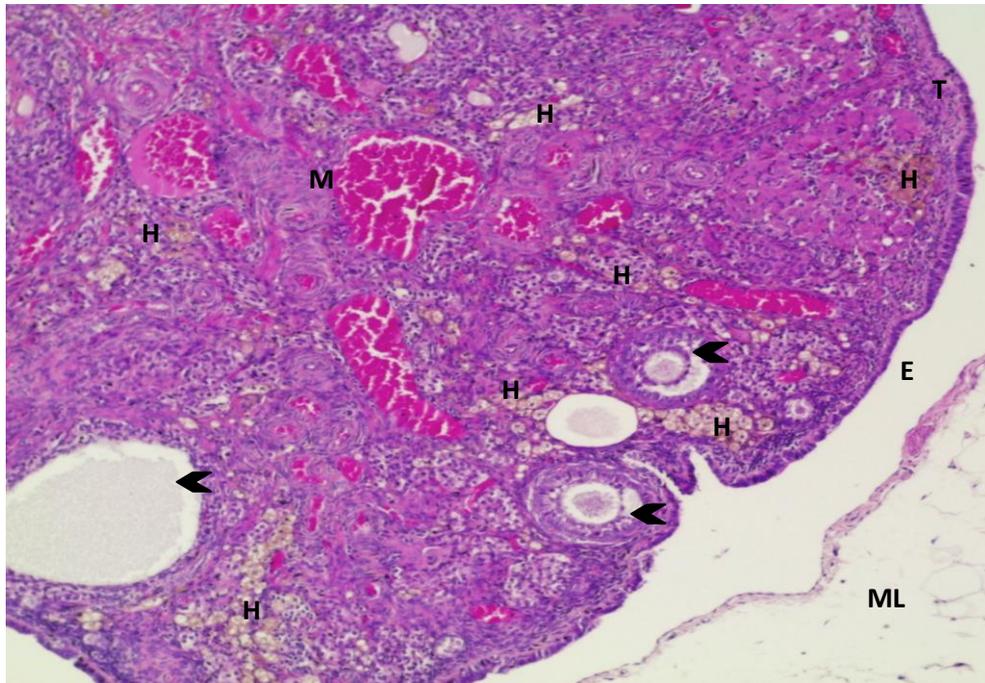
Na análise histopatológica por H.E. dos ovários identificou-se normalidade nas estruturas teciduais nas camadas cortical e medular, angiogênese, desenvolvimento folicular em vários estágios de maturação, corpos lúteos e depósito de hemossiderina (Figuras 19 e 20). Os cortes revelaram folículos ovarianos limitados externamente por um material colagenoso, entremeados por vasos na sua região medular. Limitado por um epitélio simples cúbico (Figuras 21 e 22).

A hemossiderina consiste em um tipo de pigmentação acastanhada, decorrente da hemoglobina. É evidenciada pelo acúmulo de ferro no interior das células de forma granular ou cristalina ocasionadas por grandes ou pequenas hemorragias seguidas por congestão vascular grave (KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005). Frequentemente são encontrados depósitos de hemossiderina no corpo albicans (Kühnel, 2005). Contudo este achado não apresenta relação com os procedimentos carcinogênicos utilizados, de acordo com o teste G (22,14) ajustado com Correção de Williams. Tendo ocorrência tanto em grupos tratados (I, II, III e IV) como no controle (IV). No entanto o grupo V submetido apenas a 50mg do NMU não foi diagnosticada.

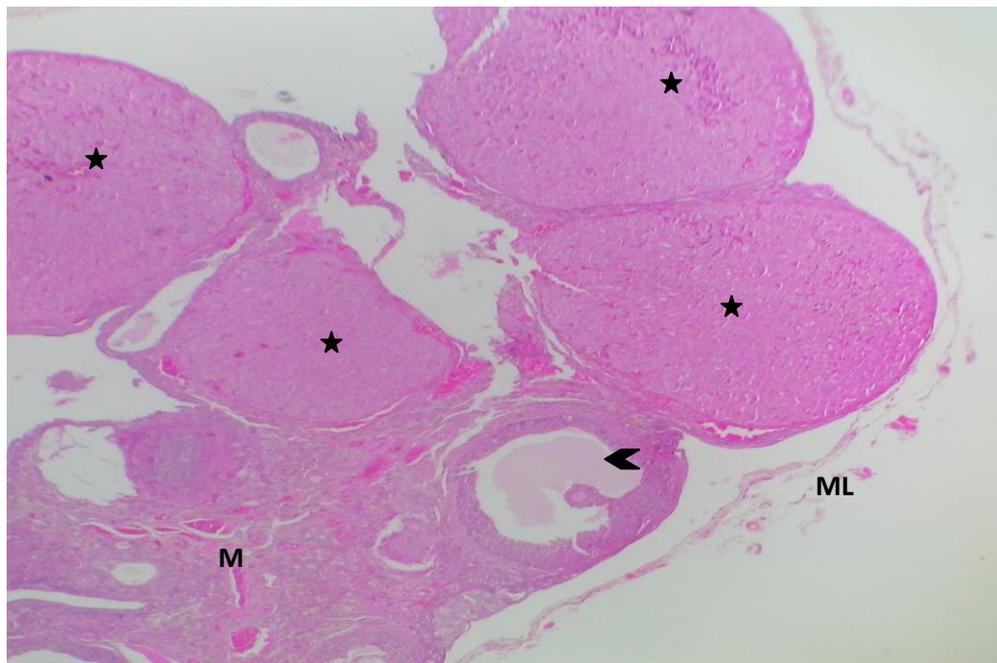
Estudos de Jones, Hunt & King (2000), escreveram a ocorrência de hemossiderina em corpos hemorrágicos ovarianos em processo de regressão causados pela hemólise num nível excessivo, ou em decorrência da congestão passiva crônica. Cambruzzi e colaboradores (2009) descreveram achados microscópicos em edema maciço de ovário a presença de alguns macrófagos vacuolados fagocitando hemossiderina. Jones, Hunt & King (2000) afirmaram que a hemossiderina é habitualmente encontrada no interior de macrófagos.

Felippe-Junior (2013) explicaram que se por um lado a falta de ferro provoca anemia, o seu excesso aumenta a probabilidade das pessoas adquirirem vários tipos de doenças tais como: câncer, infarto do miocárdio e infecção de repetição. Fatos comprovados por trabalhos, muito bem elaborados, que mostram evidências concretas. A falta de ferro é mais comum nas

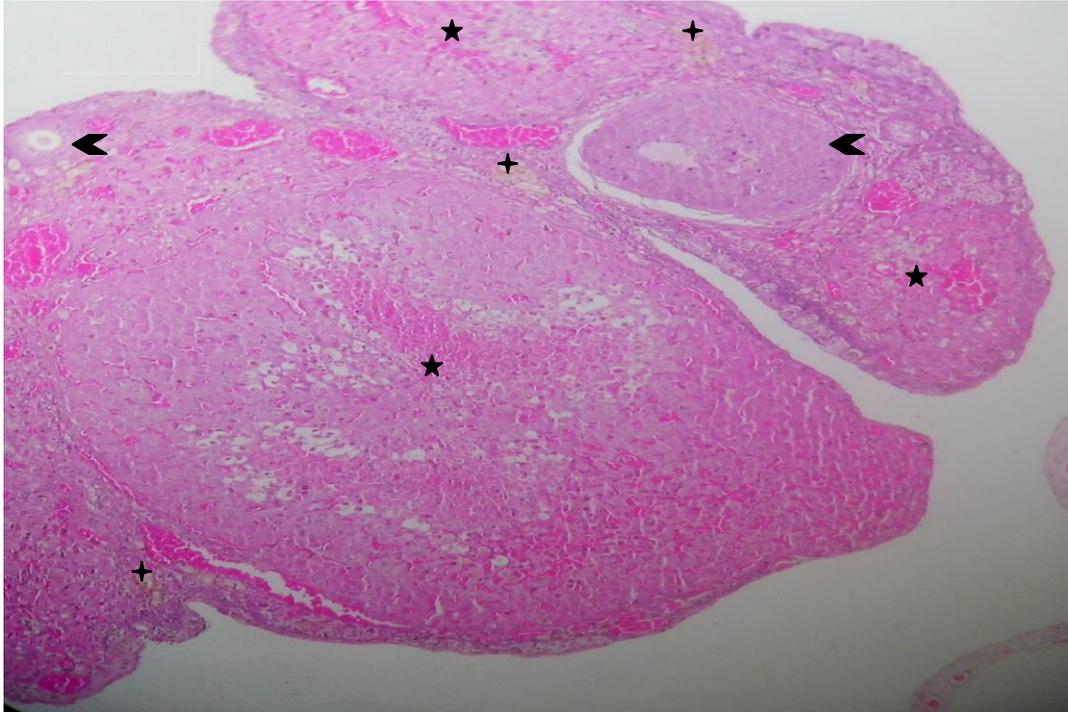
crianças e na mulher que menstrua e o seu excesso acontece nos adultos, nos idosos e na menopausa.



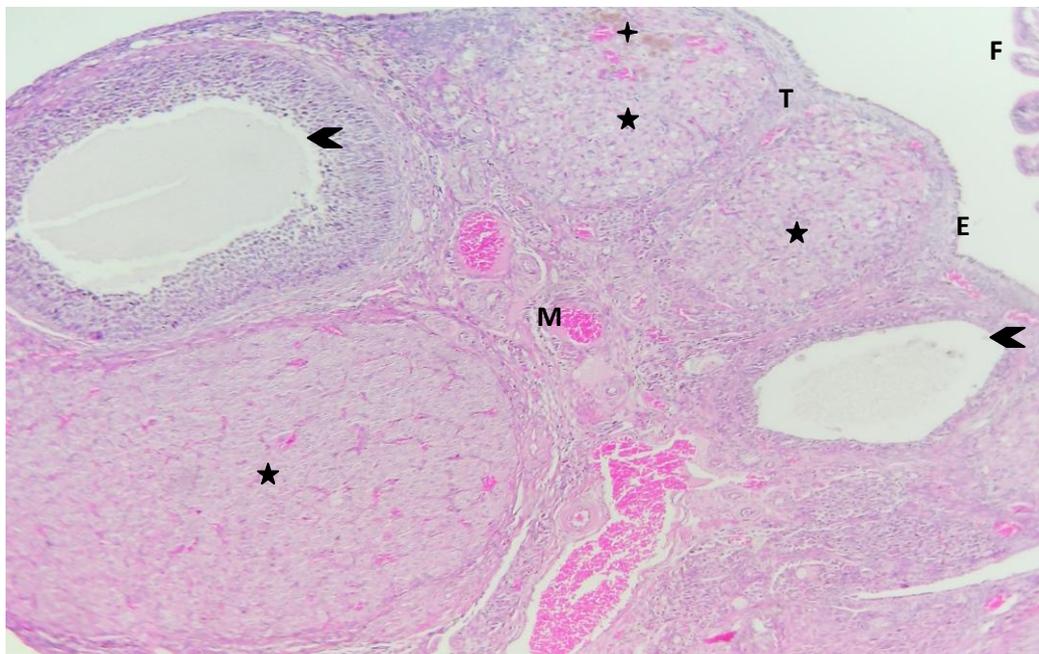
**Figura 19** – Fotomicrografia de fragmento de ovário no qual se vê um epitélio de revestimento simples cúbico (E). Na região cortical a túnica albugínea (T) e folículos em várias fases de maturação (◄). Depósito de hemossiderina multifocal (H). Região medular com inúmeros vasos sanguíneos (M). Mesovário limitando externamente (ML) (H.E. 40X).



**Figura 20:** Fotomicrografia de fragmento de ovário no qual se vê na região cortical quatro corpos lúteos (★), um folículo maduro (◄). Região medular vascularizada entremeada por tecido conjuntivo frouxo (M). Mesovário limitando externamente (ML) (H.E. 40X).



**Figura 21:** Fotomicrografia de fragmento de ovário no qual se vê na região cortical três corpos lúteos (★), o maior com células de núcleo picnótico e citoplasma vacuolizado em degeneração. Depósito de hemossiderina multifoca (†). Folículos em maturação (◀) (H.E. 40X).



**Figura 22:** Fotomicrografia de fragmento de ovário no qual se vê um epitélio de revestimento simples cúbico (E) seguido da túnica albugínea delimitada (T). Na região cortical dois folículos antrais (◀). Três corpos lúteos (★), um com hemossiderina (†). Região medular com inúmeros vasos (M). Externamente fímbrias da tuba uterina (F) (H.E. 100X).

#### **4 CONCLUSÕES**

Em virtude da normalidade no diagnóstico por imagem e histológico o modelo experimental de carcinogênese, com ênfase dos ovários, em Ratas Wistar, utilizando o NMU intraperitoneal associado ou não à pinealectomia mostrou inviabilidade prática neste estudo, devido a ausência de tumores. É necessário o refinamento e otimização do modelo experimental de agentes indutores tumorais ovarianos assim como pesquisas com a glândula pineal para que tratamentos antitumorais sejam estabelecidos.

## REFERÊNCIAS

ANISIMOV, V. N. Effects of age on dose-response relationship in carcinogenesis induced by administration of N-nitrosomethylurea in female rats. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. 1988, 114:628-635.

BARBOSA, N. B. V. Efeito de compostos orgânicos de selênio em modelos experimentais de câncer e diabetes mellitus. 2006. p. 165. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart - São Paulo Livraria Editora Ltda. 1976. cap. 1-9, p.27-80, 257 p.

CAMBRUZZI, E.; ZETTLER, C. G.; ZETTLER, E. W.; JOTZ, G.; MOTTA, R. R.; LENZI, L. G. S.; SILVA, J. S. Edema maciço de ovário. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, 53 (3): 261-264, jul-set. 2009.

FELIPPE-JUNIOR, J. O excesso de ferro aumenta a incidência de câncer, de infarto do miocárdio e de infecções de repetição. Disponível em: [http://www.medicinacomplementar.com.br/ferro\\_cancer\\_infarto.asp](http://www.medicinacomplementar.com.br/ferro_cancer_infarto.asp). Acesso em: 30 nov. 2013.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 375-382, 2002.

GIULLINO, P. M.; PETTIGREW, H. M.; GRANTHAM, F. H.N-Nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, Md., US, v. 54, p. 401-414, 1975.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e Manejo**. In: \_\_\_\_\_. 3 ed. Biologia e clínica de coelhos e roedores. São Paulo: Roca, 1993. cap. 2. p. 9-55.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole Ltda, 2000. p. 1181–1182.

KAPIL, U. et al. Association of vitamin A, vitamin C and zinc with laryngeal cancer. **Indian Journal Cancer**, Bombay, v. 40, p. 67-70, 2004.

KÜHNEL, W. Órgãos sexuais femininos. In: \_\_\_\_\_. **Citologia, histologia e anatomia microscópica**. Ed. 11. São Paulo: Artmed, p.400-437, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran: **Patologia - Bases patológicas das doenças**. 7. Ed. 41p. Elsevier, 2005.

MASSONE, F. Neuroleptoanalgesia e anestesia dissociativa. In: \_\_\_\_\_. 2 ed. **Anestesia Veterinária – Farmacologia e Técnicas**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1994b. cap. 8. p. 92-97.

MASSONE, F. Técnicas anestésicas de Laboratório. In: \_\_\_\_\_. 2 ed. **Anestesia Veterinária – Farmacologia e Técnicas**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1994a. cap. 10. p. 105-110.

McCORMICK, G. M.; MOON, R. C. Effect of pregnancy and lactation on growth of mammary tumors induced by 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene (DMBA). **British Journal of Cancer**, Edinburgh, Inglaterra, GB, v. 19, p. 160-166, 1965.

PAULUS, M.J.; GLEASON, S.S.; KENNEL, S.J.; HUNSICKER, P.R.; JOHNSON, D.K. High resolution x-ray computed tomography: An emerging tool for small animal cancer research. **Neoplasia**. v.2, nos.1-2, pp. 62-70, January-April 2000.

SOARES JÚNIOR, J. M. et al. Influência da glândula pineal sobre a ingestão de água e NaCl em ratas normais e ooforectomizadas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 317-321, 1999.

TARSO, L.; MEYER, F. S.; CIOATO, M. G.; MEURER, L.; SCHIRMER, C. C. O modelo experimental de carcinogênese gástrica induzido por N-Methyl-N-Nitrourea em ratos F344 e camundongos C3H é válido para os ratos Wistar? **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**. 2011; 24 (1): 55-58.

*“e o seu semblante já não era triste.”*

*I Samuel 1: 18*

