

ADRIELI FASOLO RIBEIRO

***ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELO
EFEITO DA ACETONA CIANIDRINA EM FÍGADO, RINS,
CORAÇÃO E PULMÃO DE CAMUNDONGOS***

CAMPO GRANDE

2012

ADRIELI FASOLO RIBEIRO

***ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELO
EFEITO DA ACETONA CIANIDRINA EM FÍGADO, RINS,
CORAÇÃO E PULMÃO DE CAMUNDONGOS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva

CAMPO GRANDE

2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

ADRIELI FASOLO RIBEIRO

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELO EFEITO DA
ACETONA CIANIDRINA EM FÍGADO, RINS, CORAÇÃO E PULMÃO DE
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Dedico este trabalho à minha família que sempre me incentivou cumprir meus objetivos e enfrentar mais este desafio, e a Dra. Landara que foi o motivo maior da minha persistência.

AGRADECIMENTOS

- À **Deus**, por me dar forças e me guiar, buscando o melhor caminho sempre.

- À orientadora **Profa. Dra. Iandara Schettert Silva**, que me deu total apoio desde o início, mas principalmente por ter se mostrado paciente e ser um exemplo de profissional, indiretamente me incentivando nunca desistir. Muito obrigada!

- Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste**, através de professores e funcionários, que muito contribuíram para a conclusão deste trabalho.

- À **Profa. Dra. Doroty Mesquita Dourado** que gentilmente abriu as portas do laboratório, cedendo espaço, horários e principalmente atenção, dedicando às vezes muito de seu tempo para contribuir com meu objetivo.

- À **minha família** que sempre me apóia e me incentiva, mas em especial à minha mãe, que por muitas vezes foi indispensável para que eu me dedicasse a este trabalho.

- Às **minhas amigas** e ao **Adriano Silveira** que apesar de não contribuírem diretamente, muito me ajudaram, dando força e palavras de incentivo. Obrigada.

“A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

RIBEIRO AF. **Alterações histopatológicas causadas pelo efeito da acetona cianidrina em fígado, rins, coração e pulmão de camundongos.** Campo Grande; 2013. [Dissertação – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Analisar os efeitos da acetona cianidrina sobre as características histopatológicas de fígado, rins, coração e pulmão de camundongos saudáveis. **Métodos:** Foram utilizados 30 camundongos, *Mus musculus*, linhagem swiss, separados em dois grupos de 15 animais (machos e fêmeas), e divididos em 3 subgrupos (n=5), onde receberam doses diferenciadas de acetona cianidrina, sendo: 1,9 mg\Kg a dose mais baixa, 2,86 mg\Kg a dose intermediária e 4,38 mg\Kg a superdosagem. Avaliaram-se alterações motoras e de comportamento e a microscopia dos órgãos em evidência. As aplicações foram realizadas durante 3 dias no mesmo horário, os animais ficaram em observação por mais 3 dias e a eutanásia foi realizada após 15 dias. As lâminas foram coradas em Hematoxilina Eosina e Tricrômio de Masson para realização de análise quantitativa e morfológica. **Resultados:** A tabela de avaliação comportamental comprova que há alterações motoras evidenciadas após aplicação da substância, porém as mesmas voltam ao seu estado normal em até 15 minutos. Observou-se alterações na estrutura dos órgãos, como congestão e presença de líquido no coração, nos rins constataram-se degeneração de túbulos e diminuição dos glomérulos além de necrose coagulativa; pulmão com presença de macrófagos circundantes, áreas de fibrose, alvéolos espessos e congestão celular e o fígado, órgão aparentemente mais afetado, encontrou-se em total desorganização celular, com notável perda da estrutura morfológica característica do órgão além de hemácias congestionadas e hepatócitos perdendo núcleo. **Conclusão:** Pode-se concluir que houve alterações morfológicas causadas por acetona cianidrina como danos celulares, levando a apoptose e a adaptação das células caracterizadas por degeneração dos túbulos renais e diminuindo o tamanho e número de glomérulos do rim. Fibrose pulmonar, a presença de macrófagos no espaço alveolar, engrossou septos e desorganização estrutural. Perturbação generalizada de estrutura do fígado, hepatócitos diferentes tamanhos e perda de núcleo e nas células de gordura cardíacas hemorragia e fibrose.

Palavras chave: Acetona Cianidrina, morfologia, citotoxicidade, apoptose.

ABSTRACT

RIBEIRO AF. **Histopathological changes caused by the effect of acetone cyanohydrin in liver, kidney, heart and lung of mice.** Campo Grande; 2013. [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

Objective: Analyze the effects of acetone cyanohydrin on the histopathology of liver, kidneys, heart and lungs of healthy mice. **Method:** Were used 30 mice, *Mus musculus*, swiss strain. They are separated into two groups of 15 animals (male and female) and were distributed according to quantities of cyanohydrins acetone. Were observed motor and behavior changes and microscopic abnormalities quantitatively and qualitatively, by hematoxylin- eosin and Masson tricromic stain. **Results:** The animals showed in the behavior proves that there are motor abnormalities after use the substance, but they return to normal within 15 minutes. The histological analysis shows changes in the structure of organs, such as congestion and fluid in the heart, kidneys were noted degeneration of tubules and glomerulo in addition to decreased coagulation necrosis, lung macrophages surrounding areas of fibrosis, thick congestion and liver cell, apparently most affected organ, found himself in total cellular disorganization, with notable loss of morphological structure characteristic of the body as well as erythrocytes and hepatocytes losing congested core. **Conclusion:** It can be concluded that there were morphological changes caused by acetone cyanohydrin like cell damage and leading to apoptosis and cell adaptation characterized by degeneration of renal tubules and decreasing the size and number of glomerulo in the kidney. Lung fibrosis, presence of macrophages in the alveolar space, thickened septa and structural disorganization. Generalized disruption of liver structure, hepatocytes varying sizes and core loss and in the heart fat cells, hemorrhage and fibrosis.

Keywords: Cyanohydrin acetone, morphology, cytotoxicity, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotomicrografia mostrando hemáceas congestionadas no coração de camundongos do grupo I. O tecido encontra-se aparentemente normal (Aumento 40x, HE).

Figura 2- Presença de células adiposas na figura A e hemácias congestionadas na figura B do grupo II (Aumento 40x, HE).

Figura 3- Mostrando em A, fibroblastos com seus núcleos alongados e em B presença de células adiposas. Coloração HE, aumento 40X.

Figura 4- Deposição proteinácea em A e área de fibrose em B (Aumento 40x, TM).

Figura 5 - Medidas longitudinais (log) dos corpúsculos renais dos ratos submetidos aos tratamentos testados.

Figura 6- Medidas transversais dos corpúsculos renais dos ratos submetidos aos tratamentos testados.

Figura 7- Congestão vascular (cv) em A (aumento 40x, HE) e áreas de fibrose em B (aumento 40x TM). Ambas pertencentes ao grupo I.

Figura 8- Fotomicrografia do rim de camundongos do grupo II, a seta aponta deposição de proteína, congestão vascular (cv) em A e degeneração hidrópica em B. (Aumento 40x, HE)

Figura 9- Deposição de proteína e acúmulo de carboidratos neutros dos envoltórios tubulares em A e hiperemia glomerular em B, espaço de Bowman (*) (Aumento 40x, HE- Grupo III).

Figura 10- Fotomicrografia do fígado de animais do grupo II (Aumento 10x, TM em A e HE em B), seta apontando o espaço porta, células de Kupfler, veias e artérias.

Figura 11- Presença de hemáceas congestionadas em A, vacúolos no citoplasma e hepatócitos de tamanhos variados e perda de núcleo em B. Fotomicrografia de animais do grupo III. (Aumento 40x, HE).

Figura 12- Fotomicrografia de pulmão de um animal do grupo III. Alvéolos pulmonares em A, septos espessados, macrófagos no espaço alveolar. Em B, congestão vascular e áreas de fibrose.

Figura 13- Fotomicrografia de pulmão (HE, 40X). Em A, seta mostrando mucosa e congestão celular. Em B, seta apontando o lúmen do brônquio e congestão celular nos sacos alveolares.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Preparo e diluição das doses de AC X quantidade aplicada.

Tabela 2- Distribuição dos animais por grupo.

Tabela 3- Parâmetros relativos à análise comportamental após administração por via intraperitoneal de acetona cianidrina em doses crescentes por grupo.

Tabela 4- Toxicidade aguda da acetona cianidrina de acordo com a via de administração e o número de mortes a partir da administração intraperitoneal em doses crescentes da respectiva amostra.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3 OBJETIVO GERAL.....	20
3.1 Objetivos específicos	
4 MÉTODOS.....	21
4.1 Tipo de estudo.....	21
4.2 Amostra.....	21
4.3 Delineamento.....	21
4.3.1 Procedimentos Experimentais.....	21
4.3.2 Intoxicação aguda por Acetona cianidrina.....	22
4.3.3 Distribuição dos grupos	23
4.3.4 Observação do comportamento.....	23
4.4 Eutanásia.....	24
4.5 Coleta de amostras.....	24
4.6 Preparo histológico.....	24
4.7 Análise e documentação fotográfica.....	25
4.8 Análise estatística.....	25
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A citotoxicidade e a apoptose têm sido estudadas para que o entendimento de seus mecanismos possa auxiliar na descoberta de novos produtos com potencial terapêutico.

Segundo Grivicich, Regner e Brondani da Rocha (2007), a apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido onde ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegram em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório.

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (Nicholson, 2000).

A grande incidência de câncer no mundo faz com que cada vez mais aumente a busca de pesquisas e terapias, mais seguras e eficazes, para prevenção e combate do mesmo. Apesar dos esforços despendidos, o sucesso no tratamento de tumores tem se mostrado discreto, devido ao grau de agressividade da doença e os mecanismos de escape das células neoplásicas, e principalmente pela toxicidade medular causada pelos agentes anti-neoplásicos devido à ausência de seletividade destes para as células

neoplásicas, o que limita suas doses fazendo com que muitas vezes elas sejam incapazes de eliminar todas as células tumorais (RAFFERTY et al., 1996).

Avaliações de toxicidade aguda são conduzidas pela administração de doses estabelecidas em camundongos machos e fêmeas, após 10 a 15 dias. Os achados dos estudos de toxicidade devem ser avaliados após a observação dos efeitos e posteriormente por necropsia e achados microscópicos. Tal avaliação deve ainda incluir as relações entre os possíveis efeitos da substância teste conforme a dose, a presença ou ausência de incidentes severos, anormalidades incluindo lesões locais, órgãos alvos, infertilidade, anormalidades clínicas, efeitos sobre a reprodução, alterações de peso, mortalidade e outros efeitos tóxicos (OECD, 1996).

O cianeto é uma substância comum no meio ambiente, podendo ser encontrado em diversos meios, como a água, materiais plásticos e acrílicos, fumaça de cigarro e facilmente nos vegetais, que são uma importante fonte de cianeto, presente na forma de glicosídeos cianogênicos.

O ácido cianídrico é produzido após a ocorrência de danos mecânicos ou fisiológicos no tecido da planta, quando as principais substâncias cianogênicas, a linamarina e lotaustralina, em presença de água, entram em contato com a enzima linamarase, que se encontram separadas no tecido vivo e íntegro. A enzima localiza-se na parede celular e as substâncias cianogênicas nos vacúolos. Nessa primeira fase, são produzidas glucose e acetona cianidrina e, na segunda fase, a enzima hidroxinitrilo liase catalisa a degradação da acetona cianidrina para a produção de acetona e ácido cianídrico (HCN). A enzima dessa segunda fase, também, se encontra na parede celular e a reação pode ocorrer espontaneamente quando o pH é superior a quatro e a temperatura superior a 30°C (McMahon et. al., 1995, citados por Cavalcanti e Araújo 2000).

De acordo com Cavalcanti e Araújo, 2000, o organismo animal tem uma capacidade de eliminar de 0,5 a 3,5 mg de HCN por quilograma de peso vivo, por meio da utilização de aminoácidos sulfurados (metionina e cistina), que, sob a ação da enzima rodanase, produzem tiocianatos que são eliminados pela urina.

RAMALHO; AYDOS; CEREDA, (2010), desenvolveram um estudo *in vitro* usando a acetona cianidrina derivada da linamarina, extraída da mandioca, contra células tumorais retiradas de camundongos. Trata-se de uma substância natural, mas facilmente sintetizada em laboratório. A pesquisa confirma a hipótese de que é possível avaliar o efeito do cianeto sobre células tumorais usando um modelo de liberação diferente daquele relatado na literatura, que usa a terapia gênica para produzir cianeto livre, a partir de linamarina. Em concentrações menores (0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ocorreu mais de 90% de morte celular após 24 horas de incubação, isto comprova a capacidade da célula tumoral de se intoxicar de maneira irreversível e acumulativa com a acetona cianidrina. Não aconteceu o mesmo quando comparados com linfócitos humanos, que nas mesmas doses e nos mesmos tempos de incubação atingiram um máximo de 30% de morte celular, o que sugere uma atividade de rodanase diferenciada entre as duas células (RAMALHO; AYDOS; CEREDA, 2010)

É muito importante que se faça uma avaliação pré-clínica de toxicidade de uma droga, pois sua administração incorreta pode acarretar em inúmeros efeitos deletérios a órgãos vitais. A pesquisa experimental é uma porta aberta para a evolução dos tratamentos, uma vez que todo pesquisador tem o intuito de buscar novas e melhores soluções para as doenças e assim substituir alguns tratamentos convencionais, visando uma boa taxa de eficácia, baixo custo, baixa frequência de efeitos colaterais e de fácil execução.

Diante disso, através de ensaio *in vivo*, avaliaram-se os possíveis efeitos da substância acetona cianidrina em células saudáveis, caracterizando-os de forma histopatológica, buscando oportunidades e novas alternativas que visam o progresso desses estudos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Acetona Cianidrina

Apesar de ser uma substância considerada altamente tóxica, o cianeto pode ser encontrado no ambiente nas mais diferentes formas, como exemplo na água, acrílicos, fumos e até em algumas plantas, na forma de glicosídeos cianogênicos (linamarina) praticamente estáveis em condições ambientais. Pela exposição ao cianeto ser praticamente inevitável, em doses moderadas o organismo desenvolveu métodos de eliminação, ou desintoxicação naturais da substância. Todavia, se a quantidade for superior aos que os mecanismos de desintoxicação naturais são capazes de eliminar a intoxicação deve ser considerada, pois quando absorvido, o cianeto é imediatamente distribuído pelas células e tecidos. Uma quantidade significativa de linamarina permanece intacta e é excretada na urina, pois ela inibe a $\text{Na} + \text{K} + \text{ATPase}$ causando desequilíbrio eletrolítico no interior da célula. Este processo é determinado pelos radicais livres gerados pelos ciclos de hipóxia / normóxia criados por cianeto, libertando linamarina, que causam a peroxidação lipídica e os danos da membrana celular (KAMALU, 1995).

A acetona cianidrina é usada comercialmente na produção de acrílicos. Trata-se de um líquido aquoso, com odor de amêndoas, incolor e miscível em água. É conhecida também como 2-metil ou Lactonitrile – Hydroxisobutironitrile, apresenta massa molecular de 85,11, densidade de 0,925-25°C e ponto de fusão de -19 ° C. A liberação de cianeto depende somente do pH e a sua desintoxicação ocorre principalmente devido a enzima rodanase (IDIBIE et al., 2007).

A acetona cianidrina apresenta capacidade de envenenamento cumulativo nas células cancerosas, isso faz com que a sobrevivência dessas células diminua com o aumento do tempo de exposição a substância (RAMALHO; AYDOS; CEREDA, 2010).

Segundo Aminlari et al.; (2007) a rodanase (tiosulfato: sulfurtransferase cianeto) é uma enzima com atividade onipresente em todos os organismos vivos. Trata-se de uma enzima que atua na desintoxicação de cianeto e a sua atividade mais elevada foi observada no rim, seguido de fígado, cérebro, pulmão, estômago e músculo. O tiocianato é a forma menos tóxica e é eliminada por via renal. A desintoxicação ocorre em todas as células humanas normais, mas as células cancerosas, que têm uma baixa atividade da rodanase tornam-se vulnerável aos efeitos tóxicos do cianeto.

Em 2002, Kousparou, Epenetos e Deonarain compararam o efeito da acetona cianidrina, em células normais a avaliação foi satisfatória e a maior capacidade citotóxica ocorreu em células com tumor de Ehrlich, como também já foi descrito em outros estudos utilizando cianoglicosídeos demonstrando a ausência de intoxicação e de inviabilidade das células normais, possivelmente devido à atividade reduzida da rodanase se mostrar mais evidente nas células tumorais (ICIEK E WLODEK, 2001).

RAMALHO; AYDOS; CEREDA, (2010), acredita que os resultados são encorajadores para o uso de acetona cianidrina na luta contra o câncer, mas que necessitam de mais investigação, especialmente em modelos animais (*in vivo*) para estabelecer uma correlação com os resultados descritos *in vitro*.

2.2 Toxicidade

Considerando a OECD (1996), os testes de toxicidade de substâncias desconhecidas devem seguir alguns princípios, o principal é que a substância deve ser administrada em doses crescentes a vários grupos de machos e fêmeas. Dosagens diárias, inclusive imediatamente antes da eutanásia, observações diárias quanto ao comportamento, efeitos esperados e efeitos adversos pré e pós- administração da substância e após a eutanásia deve-se detalhar as alterações histopatológicas em pulmão, fígado, rins e coração.

O cianeto é uma substância que apresenta efeito alvo, por ter efeito tóxico sobre todas as formas vivas, em específico sobre a cadeia respiratória. A enzima rodanase promove a desintoxicação da célula através de um

mecanismo de eliminação do cianeto. Isso não acontece com as células cancerígenas devido a ausência desta enzima (KOUSPAROU et al., 2002).

2.3 Caracterização histopatológica e causas da lesão celular e/ou adaptação celular, segundo McGavin e Zachary, 2009.

“Classificam-se de várias maneiras as causas de lesão celular, podendo ser extrínsecas como as toxinas ou então intrínsecas como as mutações genéticas.

Mecanismos gerais da lesão incluem depleção de ATP (causados por hipóxia), lesão de membrana (radicais livres-EROS), distúrbios do metabolismo celular e lesões genéticas.

A lesão celular pode ser subletal e resultar em vários tipos de degenerações celulares ou acúmulos e/ou adaptações celulares conforme a lesão. Basicamente as três maneiras importantes são a adaptação, a degeneração ou acúmulos intracelulares ou extracelulares e morte. Ainda, sob o ponto de vista patológico, a lesão celular reversível ocorre quando a celular pode se adaptar ou se recuperar e, então retornar à função normal ou próxima da normal. A lesão celular irreversível resulta na morte celular. De forma resumida, as alterações citomorfológicas da lesão celular irreversível incluem a lesão da membrana plasmática, influxo de cálcio na célula, tumefação e vacuolização mitocondrial, densidades amorfas nas mitocôndrias e tumefação lisossomal.” (McGavin e Zachary, 2009).

2.3.1 Deficiência de oxigênio

“A hipóxia é uma das causas mais comuns e importantes de lesão e morte celular. É a redução parcial nas concentrações de O₂ fornecidas às células e tecidos. O oxigênio é criticamente importante para a fosforilação oxidativa, principalmente nas células altamente especializadas, como os neurônios, hepatócitos, miócitos cardíacos e células dos túbulos renais. A hipóxia pode ser resultante de uma oxigenação inadequada do sangue como resultado de insuficiência cardíaca ou respiratória, perda ou redução da

perfusão sanguínea (isquemia), redução no transporte de O₂ no sangue e também por bloqueio das enzimas respiratórias celulares que ocorre na intoxicação por cianeto.” (McGavin e Zachary, 2009).

2.3.2 Substâncias químicas, drogas e toxinas

“As drogas produzem efeitos em populações específicas de células pela modificação da função e morfologia. Já as substâncias químicas e toxinas, podem bloquear ou estimular os receptores de membrana celular, alterar os sistemas enzimáticos específicos, produzir radicais livres tóxicos, alterar a permeabilidade celular, modificar vias metabólicas e destruir componentes celulares estruturais.” (McGavin e Zachary, 2009).

2.3.3 Características histopatológicas da apoptose

“As células isoladas apresentam retração, ocorre cromatina condensada, o citoplasma é fragmentado, ocorrem brotos citoplasmáticos contendo fragmentos de núcleo, que se formam na superfície e separam-se, sendo encontrados nas células adjacentes e em fagócitos como corpúsculos apoptóticos e finalmente não há inflamação.” (McGavin e Zachary, 2009)

2.3.4 Autofagocitose

Através de microscopia de luz, os vacúolos autofágicos podem aparecer como inclusões eosinofílicas, que são mais comuns no fígado e rins. (McGavin e Zachary, 2009).

2.3.5 Lipidose hepática

“É o acúmulo de triglicerídeos e outros metabólitos lipídicos dentro das células parenquimatosas. Embora ocorra no músculo cardíaco e esquelético e nos rins, as manifestações mais comuns são no fígado. A lipidose pode ocorrer como resultado de um, dos cinco mecanismos: liberação excessiva de ácidos graxos livres; Diminuição da β -oxidação de ácidos graxos em corpos cetônicos e em outras substâncias devido a

lesão mitocondrial (toxinas e hipóxia); síntese prejudicada de apoproteína; combinação prejudicada de triglicerídeos e proteínas para formação de lipoproteínas; liberação prejudicada de lipoproteínas do hepatócito.” (McGavin e Zachary, 2009)

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar histopatologicamente as alterações morfológicas causadas pela acetona cianidrina em coração, pulmão, fígado e rins de camundongos saudáveis.

3.1 Específicos

Verificar as alterações histopatológicas que induzem lesão celular;

Verificar alterações histopatológicas que induzem adaptação celular;

Verificar as alterações histopatológicas que induzem a apoptose.

4 MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Foi utilizado nesta pesquisa o estudo experimental com uso de animais. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética no Uso de Animais sob o protocolo nº 265, em reunião no dia 29 de junho de 2010.

4.2 Amostra

Os camundongos foram obtidos no Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno retangulares grandes (49x34x16), forrada com cama de maravalha trocada semanalmente, em sala climatizada sob temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de 12h claro / 12h escuro, com ventilação apropriada e alimentados com água natural e ração (oferecidas “*ad libitum*”). Todos os procedimentos de manipulação com os animais seguiram os princípios éticos internacionais de uso de animais para experimento.

4.3 Delineamento

4.3.1 Procedimentos Experimentais

Após a aprovação pelo comitê de ética no uso de animais CEUA/ UFMS, os procedimentos foram realizados no laboratório de carcinogênese experimental e estudos do câncer na região centro-oeste.

4.3.2 Intoxicação aguda por Acetona Cianidrina (AC)

Utilizou-se como fonte a acetona cianidrina (AC) da marca Sigma-Aldrich, com 99% de pureza, densidade (d)=0,932 ou seja 10 μ L de AC é igual a 9,32mg.

Preparou-se uma diluição de acetona cianidrina (AC) e colocou-se 10 μ L de AC em 10 mL de Solução fisiológica (S1), ou seja, 9,32mg de AC em 10mL.

Preparo da dose 1,9 mg/Kg de peso: Pegou-se 1mL da S1 (0,932mg) que foi completada para 5mL com solução fisiológica. Desta solução aplicou-se 0,3mL (0,05592mg) via intraperitoneal em cada camundongo.

Preparo da dose 2,8 mg/Kg de peso: 1,5mL da S1 (1,398mg) mais 5mL de solução fisiológica. Desta solução aplicou-se 0,3mL (0,08388mg) via intraperitoneal em cada camundongo.

Preparo da dose 4,3 mg/Kg de peso: 2,3mL da S1 (2,144mg) mais 5mL de solução fisiológica. Desta solução foi aplicado 0,3mL (0,129mg) via intraperitoneal em cada camundongo.

Tabela 1- Preparo e diluição das doses de AC X quantidade aplicada.

Grupo / dose	S1	Solução fisiológica	Quantidade aplicada
I (1,9 mg/kg)	1 mL (0,932 mg)	4 ml	0,3mL (0,05592mg)
II (2,8 mg/kg)	1,5 mL (1,398mg)	3,5 mL	0,3mL (0,08388mg)
III (4,3 mg/kg)	2,3 mL(2,144 mg)	2,7 mL	0,3 mL (0,129mg)

4.3.3 Distribuição dos grupos

Para o presente estudo, foram disponibilizados 30 camundongos Swiss com aproximadamente 60 dias de idade, pesando em média 30g, divididos em grupos e submetidos a aplicação da substância Acetona Cianidrina em 3 diferentes concentrações. Foram 15 machos e 15 fêmeas, que apesar de terem sido mantidos separados, foram tratados de igual maneira. Devido as diferentes dosagens de acetona cianidrina os animais foram subdivididos em 3 grupos (n=5), onde foram submetidos a aplicação via intraperitoneal do produto, que foi aplicado durante 3 dias, respeitando os mesmos horários. Os animais ficaram ainda por mais 3 dias em observação para avaliação comportamental, após um período de 15 dias foram submetidos aos procedimentos de eutanásia e seus órgãos foram coletados e processados para análise histopatológica em parafina e corados com Hematoxilina- Eosina e Tricômico de Masson.

Tabela 2- Distribuição dos animais por grupo.

30 animais (♂+ ♀)	
♂ n=15 e ♀ n=15	
GRUPO (n=5)	DOSE (mg/Kg)
1	1,9
2	2,86
3	4,38

4.3.4 Observação de comportamento

A aplicação do produto foi realizada durante três dias, no mesmo horário e as mesmas doses para cada animal, onde foram avaliados os possíveis sintomas pós- aplicação durante uma hora. Os mesmos ficaram em observação até o dia da eutanásia.

4.4 Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada diante dose letal de barbitúrico Tiopental sódico intravenoso (100mg/Kg).

4.5 Coletas de Amostras

Após eutanásia cada indivíduo foi colocado em decúbio ventral sobre cama cirúrgica, logo após, foi feita a tricotomia do ventre e laparotomia abdominal. Os órgãos foram retirados e as peças foram imediatamente armazenadas em paraformaldeído com a finalidade de assegurar a preservação das estruturas morfológicas dos tecidos.

4.6 Preparo Histológico

A confecção das lâminas e a documentação fotográfica foi desenvolvida no laboratório de Toxicologia e Plantas Medicinais da Universidade Anhanguera- Uniderp, Campus III, Campo Grande – MS.

Após a fixação, impregnação e inclusão dos tecidos, os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo obtendo cortes de 5 μ m de espessura. Destes retirou-se aleatoriamente cortes, que foram colocados em lâminas e mantidas em estufa durante 30 minutos a 38C para a retirada do excesso de parafina e secagem da preparação.

Os cortes, depois de desparafinados e hidratados, foram corados pela técnica hematoxilina-eosina (HE) e tricômico de Masson (TM). Em seguida, desidratados, clarificados com xilol e montados em (Entellan® Merk).

4.7 Análise e documentação fotográfica

As imagens foram capturadas em microscópio Carl Zeiss acoplado a uma microcâmera Samsung conectada a um computador com placa de captura de imagens e o software IMAGELAB.

4.8 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0.

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson, após, foi realizada uma transformação logarítmica dos dados que foram submetidos a uma análise de variância. E ao fim utilizado o teste complementar de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi analisado o comportamento dos animais em seguida a administração da acetona cianidrina e após eutanásia, foram analisados histopatologicamente, o fígado, rins, coração e pulmões dos animais tratados com as diferentes dosagens.

Pôde-se observar que o produto induz alterações no comportamento nos primeiros minutos após sua aplicação. Na dose de 1,9 mg/Kg as reações foram discretas, pois o sinal mais evidente foi a prostração, onde os animais encontraram-se apáticos, e em 10 minutos já apresentavam normalidade.

No segundo grupo, onde os animais receberam uma dose de 2,86 mg/Kg, as reações foram notavelmente mais fortes, onde todas as fêmeas tiveram convulsão leve em pelo menos um dia de aplicação. Após convulsão, os sinais mais evidentes eram exaustão e prostração. Já os machos deste mesmo grupo apresentavam-se somente exaustos.

No terceiro grupo, onde a dosagem de acetona cianidrina foi de 4,38 mg/Kg, notou-se as reações mais intensas, pois todos os animais sofreram convulsões moderadas ou fortes, exaustão, paralisia. No segundo dia ocorreu óbito de uma fêmea, e no terceiro dia mais uma fêmea e um macho vieram a óbito, totalizando três mortes para esse último grupo. A tabela abaixo aponta os principais sintomas pós aplicação do produto.

Tabela 3: Parâmetros relativos à análise comportamental após administração por via intraperitoneal (V.I) de acetona cianidrina em doses crescentes por grupo.

	G1		G2		G3	
	F	M	F	M	F	M
Parâmetros avaliados						
Consciência		4		4		
Disposição		5				
perda da coordenação motora	1		1		1	
Reflexos						
sem resposta ao toque			5	1	1	1
Irritabilidade	1			3		
Convulsão	1		5	1	5	5
Hipnose			4		2	
Micção	3	5	4	5	5	5
Defecação	2	5	4	5	5	5
Hipotermia						
Hipertermia						
Sudorese			1		1	
pelo arrepiado	5		4	2	3	5
Prostração	5	5	5	5	4	5
Taquipnéia	2		3	5	4	1
Morte					2	1
Outros						

A convulsão é uma descarga bioenergética temporária com origem no cérebro. Desencadeia sérias alterações no organismo como perda de consciência, tonicidade muscular e controle dos esfíncteres (MILLER, 2001).

Tabela 4: Toxicidade aguda da acetona cianidrina de acordo com a via de administração e o número de mortes a partir da administração intraperitoneal (V.I) em doses crescentes da respectiva amostra.

Dose (mg/Kg)	Via de administração	Nº de animais por grupo	Nº de mortes	% Mortalidade
1	V.I	10	0	00
2	V.I	10	0	00
3	V.I	10	3	30

Camundongos machos e fêmeas Swiss, tratados por via intraperitoneal com acetona cianidrina em diferentes dosagens (1,9mg/Kg, 2,8 mg/Kg e 4,3 mg/Kg).

De acordo com as análises das lâminas histopatológicas foi possível observar áreas de congestão e acúmulo de células adiposas no tecido cardíaco (Figura1).

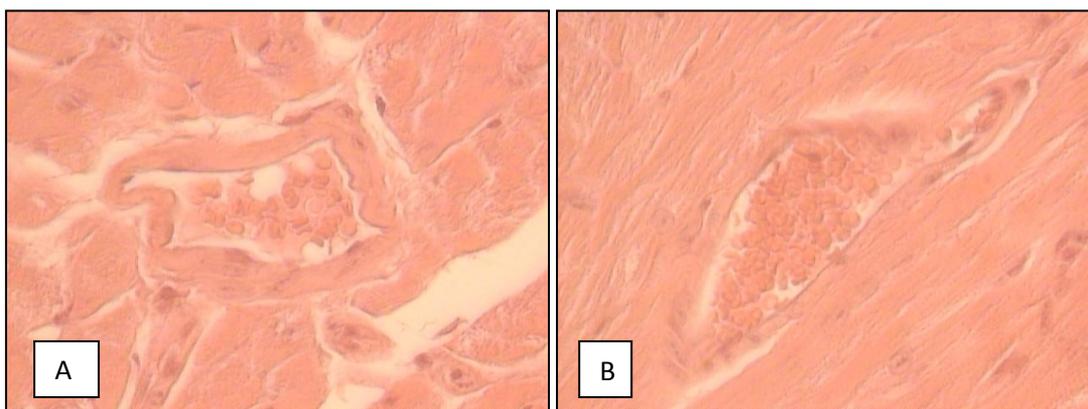


Figura 1- Fotomicrografia mostrando hemáceas congestionadas no coração de camundongos do grupo I. O tecido encontra-se aparentemente normal (Aumento 40x, HE).

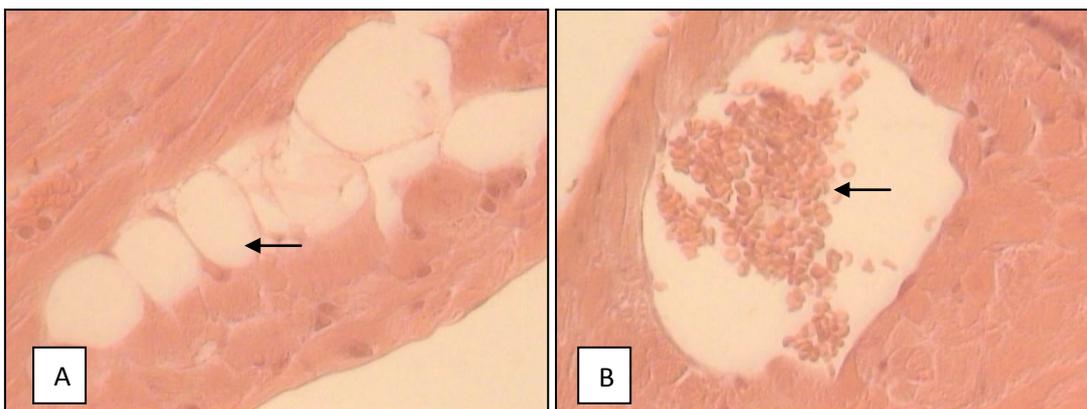


Figura 2- Presença de células adiposas na figura A e hemácias congestionadas na figura B em coração de camundongos do grupo II (Aumento 40x, HE).

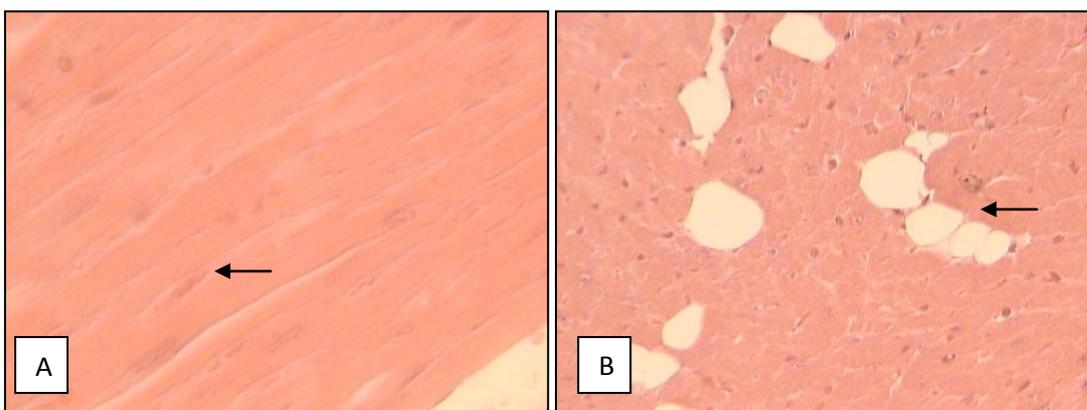


Figura 3- Mostrando em A, fibroblastos com seus núcleos alongados e em B presença de células adiposas em coração de camundongos do grupo III. Coloração HE, aumento 40X.

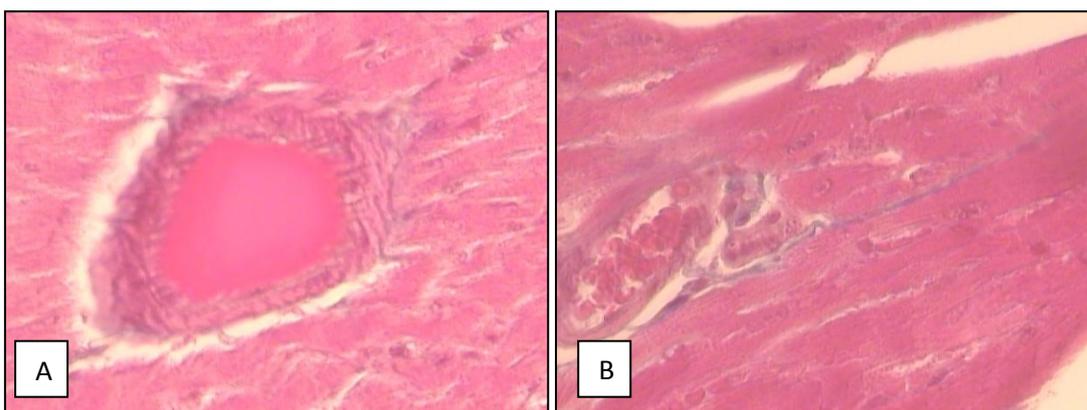


Figura 4- Deposição proteinácea em A e área de fibrose em B (Aumento 40x, TM).

O coração é um órgão de elevado metabolismo, portanto sua capacidade de adaptação a hipóxia é bastante limitada. A hipóxia miocárdica acarreta a redução da contratilidade e conseqüente redução do débito cardíaco. Uma vez que ocorre diminuição do débito cardíaco, a oferta de oxigênio fica diminuída para todo o resto do corpo. O envenenamento por cianeto, por exemplo, pode resultar em hipóxia histotóxica, que é a incapacidade dos tecidos corporais em utilizar o oxigênio disponível.

O processo de hipóxia estimula a produção de eritrócitos, acarretando uma policitemia compensatória, aumentando a viscosidade do sangue e comprometendo ainda mais o sistema cárdio-respiratório (FREEMAN, 1984; MAXWELL et al., 1990).

A partir de um processo de hipoxemia, o aumento da pressão hidrostática nos terminais venosos resultaria numa ação contrária à ação da pressão osmótica do sangue levando ao acúmulo de líquido nos tecidos instalando-se congestão e edema (JAENISCH et al., 2005).

O trabalho cardíaco é acelerado causando insuficiência do coração e o agravamento do quadro de hipertensão pulmonar (MAXWELL et al., 1987).

Considerando a morte celular causada por lesão celular irreversível por hipóxia, isquemia e lesão de membrana (oncose ou necrose oncótica), a lesão isquêmica é mais severa que a hipóxia isolada. A lesão de membrana celular causada por toxinas e outras substâncias e mecanismos pode levar à necrose. Neste caso, embora se discuta separadamente, a necrose por oncose e a apoptose podem ser vistas no mesmo tecido devido ao mesmo agente. A lesão celular por uma substância química que lesiona as mitocôndrias, por exemplo, podem liberar o citocromo C e iniciar a apoptose. Também considerado como causa de lesões severas e/ou morte celular é o influxo de Ca^{++} que ocorre após o processo de isquemia/hipóxia causando a chamada lesão de reperfusão. (McGavin e Zachary, 2009)

Os rins dos animais estudados se apresentaram com aspecto morfológico característico, sendo uma borda côncava e outra convexa, na qual se situa o hilo, onde entram e saem os vasos sanguíneos, entram nervos e

saem ureteres. Apesar das zonas cortical e medular aparentemente íntegras, foi possível identificar algumas alterações, como hemácias densamente agrupadas, demonstrando uma congestão vascular mais abundante, entre outras.

Corpúsculos renais (corte longitudinal)

Os dados obtidos a partir das medidas longitudinais dos corpúsculos renais foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson, que acusou uma distribuição não-paramétrica dos resultados. Diante disto, foi realizada a transformação logarítmica dos dados, sendo obtida então uma distribuição normal.

Os dados transformados (log) foram submetidos à análise de variância, que acusou diferenças significantes entre os grupos testados ($p=0,0006$). A fim de determinar em quais grupos encontravam-se estas diferenças, foi utilizado o teste complementar de Tukey, que apontou a média do Grupo III ($0,3308 \pm 0,1003 \mu\text{m}$) como sendo significantemente inferior às médias dos Grupos I e II ($0,3883 \pm 0,0936 \mu\text{m}$ e $0,3852 \pm 0,0807 \mu\text{m}$, respectivamente), sendo estas estatisticamente similares.

O gráfico apresentado na Figura 5 ilustra as médias e desvio-padrão dos resultados obtidos para o logaritmo das medidas longitudinais dos corpúsculos renais.

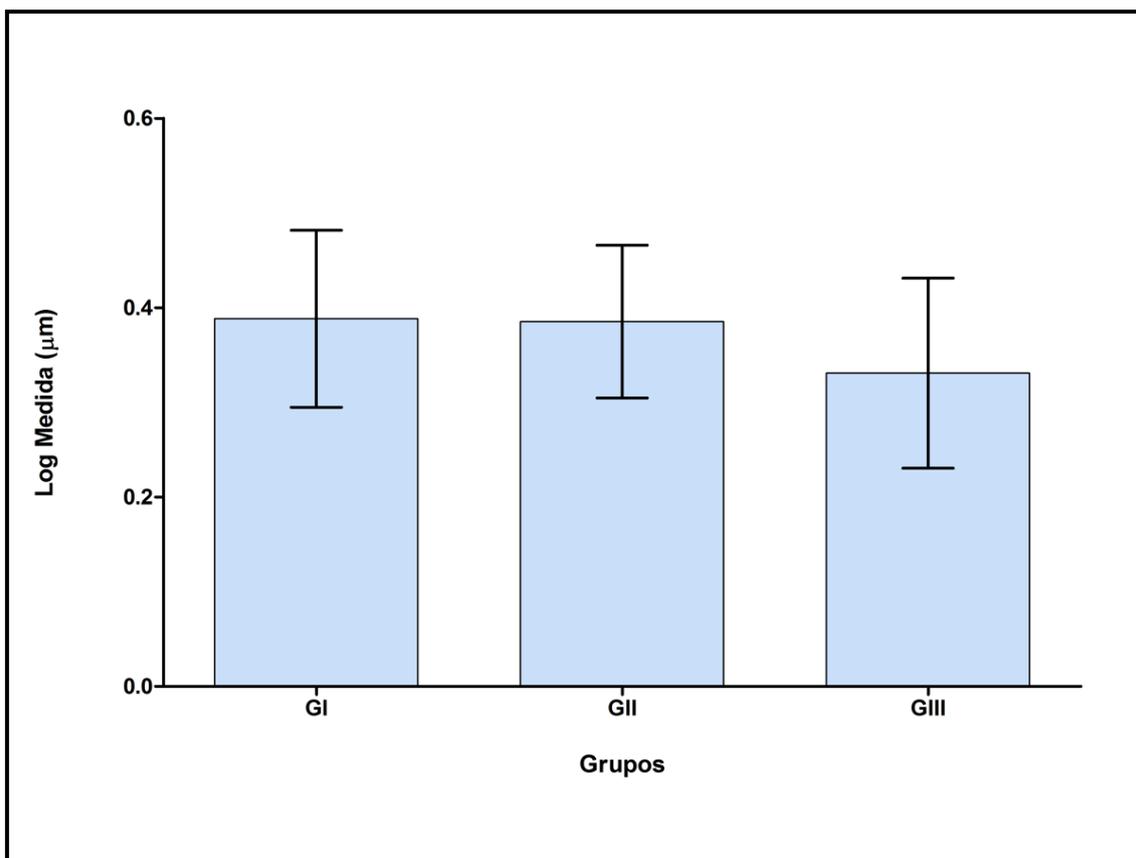


Figura 5 - Medidas longitudinais (log) dos corpúsculos renais dos ratos submetidos aos tratamentos testados.

Corpúsculos renais (corte transversal)

Os dados obtidos a partir das medidas transversais dos corpúsculos renais foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson, que acusou uma distribuição paramétrica dos resultados.

A análise de variância, aplicada aos resultados, acusou diferenças significantes entre os grupos testados ($p < 0,0001$). A fim de determinar em quais grupos encontravam-se estas diferenças, foi utilizado o teste complementar de Tukey, que apontou a média do Grupo III ($2,088 \pm 0,4481 \mu\text{m}$) como sendo significativamente inferior às médias dos Grupos I e II ($2,430 \pm 0,4562 \mu\text{m}$ e $2,607 \pm 0,4591 \mu\text{m}$, respectivamente), sendo estas estatisticamente similares.

O gráfico apresentado na Figura 6 ilustra as médias e desvio-padrão dos resultados obtidos para as medidas transversais dos corpúsculos renais.

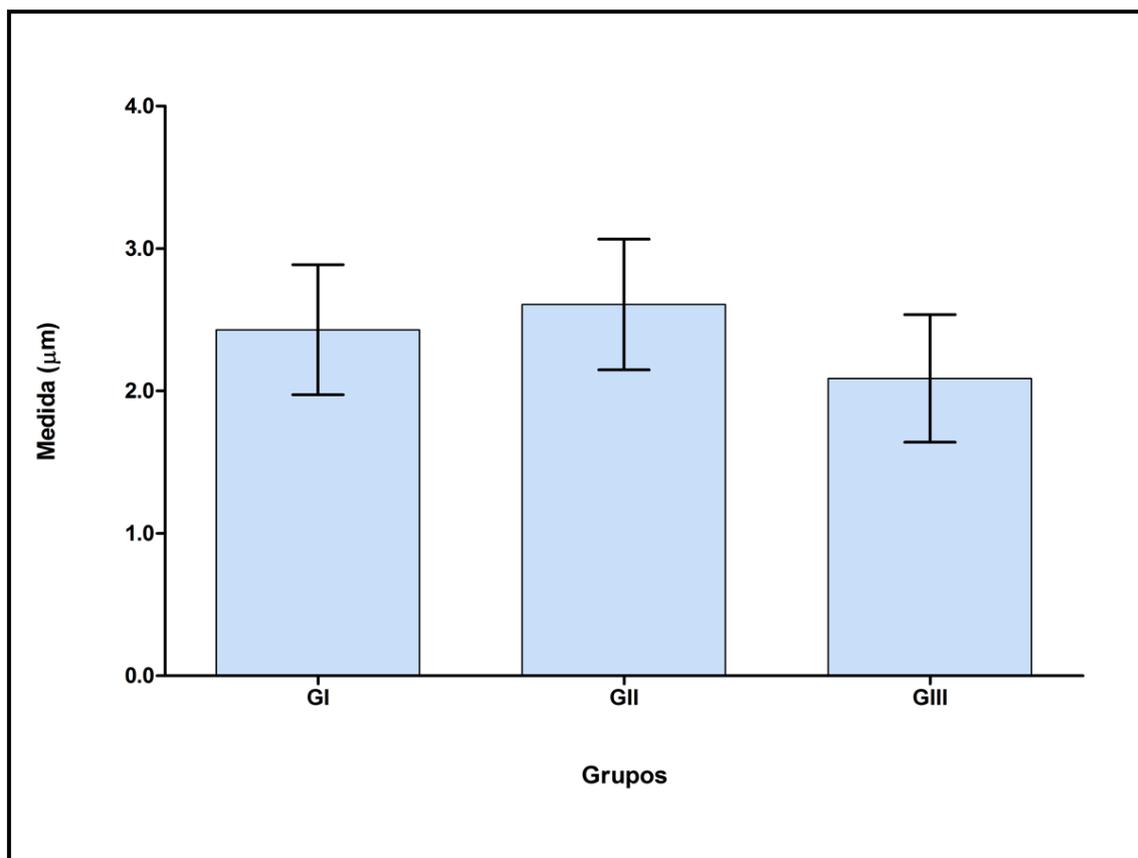


Figura 6- Medidas transversais dos corpúsculos renais dos ratos submetidos aos tratamentos testados.

Os principais achados histológicos incluem congestão vascular, degeneração hidrópica, áreas de fibrose, deposição proteinácea, necrose cortical medular, hemorragia e atrofia glomerular.

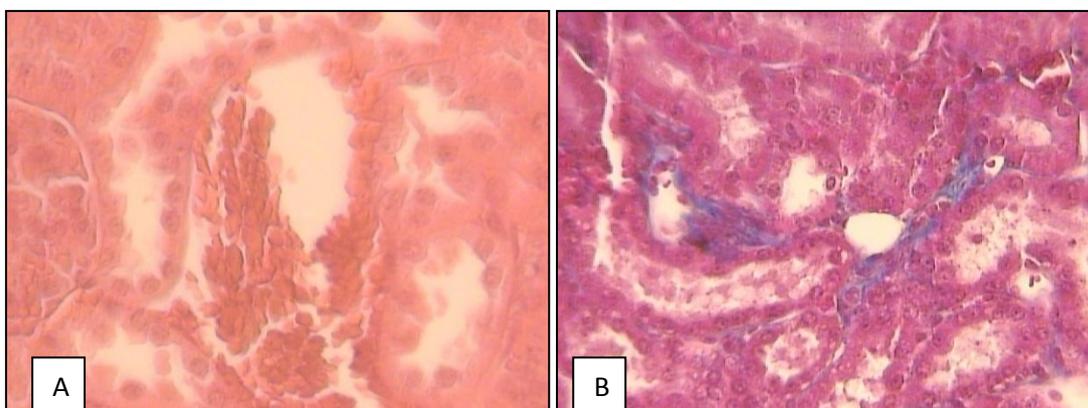


Figura 7- Congestão vascular (cv) em A (aumento 40x, HE) e áreas de fibrose em B (aumento 40x TM). Ambas pertencentes ao grupo I.

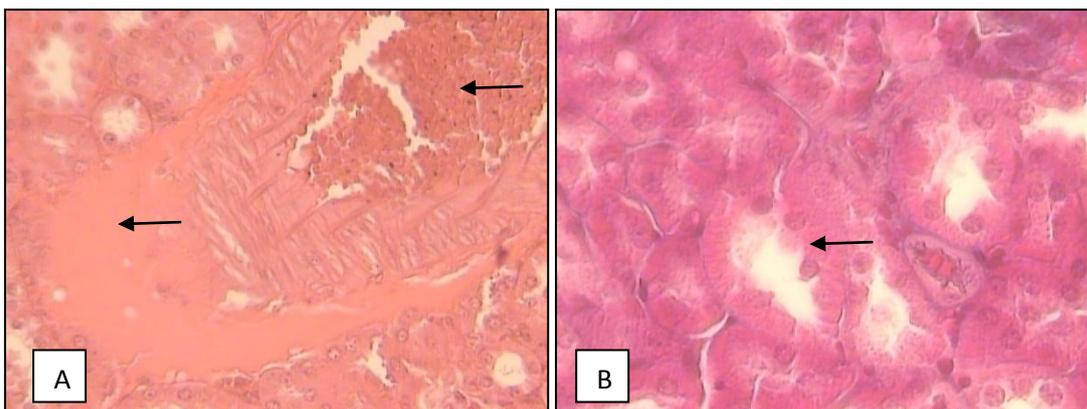


Figura 8- Fotomicrografia do rim de camundongos do grupo II, a seta aponta deposição de proteína, congestão vascular (cv) em A e degeneração hidrópica em B. (Aumento 40x, HE)

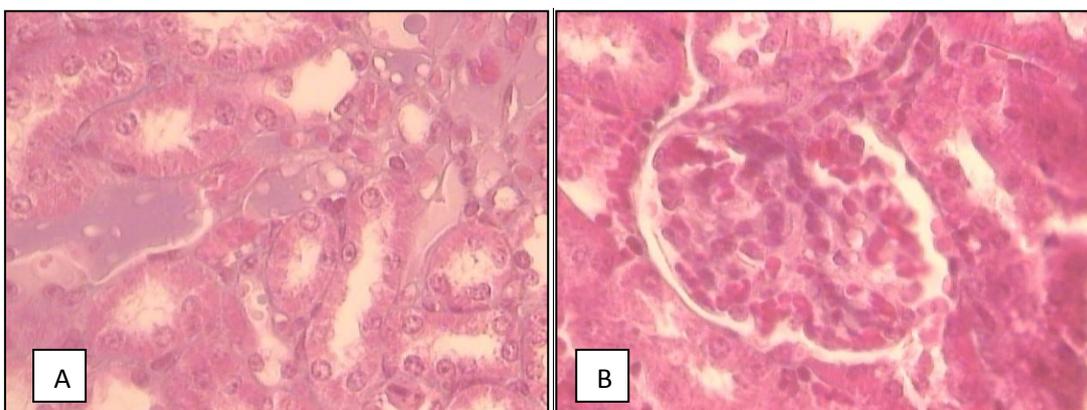


Figura 9- Deposição de proteína e acúmulo de carboidratos neutros dos envoltórios tubulares em A e hiperemia glomerular em B, espaço de Bowman (*) (Aumento 40x, HE- Grupo III).

Os rins tem por função controlar a homeostase e garantir a excreção de resíduos metabólicos, regulando o volume extracelular e balanço eletrolítico e acido-básico, pois lesões nestes órgãos podem representar danos irreversíveis. Perdas de até 50% das funções renais podem não ser percebidas, e acima disso já é considerada Síndrome Urêmica, que pode manifestar-se em praticamente todo o organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A necrose é um tipo de morte onde após uma injúria resulta em ruptura celular, devido ao aumento no volume da célula, perda da integridade da membrana plasmática e desorganização do citoplasma. Conseqüentemente, o

conteúdo celular que é liberado causa danos às células vizinhas, resultando em inflamação (GRIVICICH et al., 2007).

A necrose tubular aguda (NTA) é causada pela isquemia dos rins (falta de oxigênio nos tecidos) ou pela exposição a materiais tóxicos para o rim (agentes nefrotóxicos) que causam lesão ou destroem as estruturas internas do órgão, em particular os tecidos do túbulo renal. É umas das alterações estruturais mais comuns associadas ao desenvolvimento da insuficiência renal aguda, uma vez que a patogênese do dano renal ainda não é muito bem entendida, algumas evidências sugerem coagulação vascular disseminada, a ação de substâncias proteolíticas e vasoativas que poderiam promover e potencializar os processos de coagulação nos sítios renais (AMARAL *et al.*, 1986).

Foram encontradas alterações histológicas também no fígado dos animais, dentre elas as principais foram hemáceas congestionadas, vacúolos no citoplasma, hepatócitos perdendo seus núcleos e notável desorganização na estrutura morfológica do órgão.

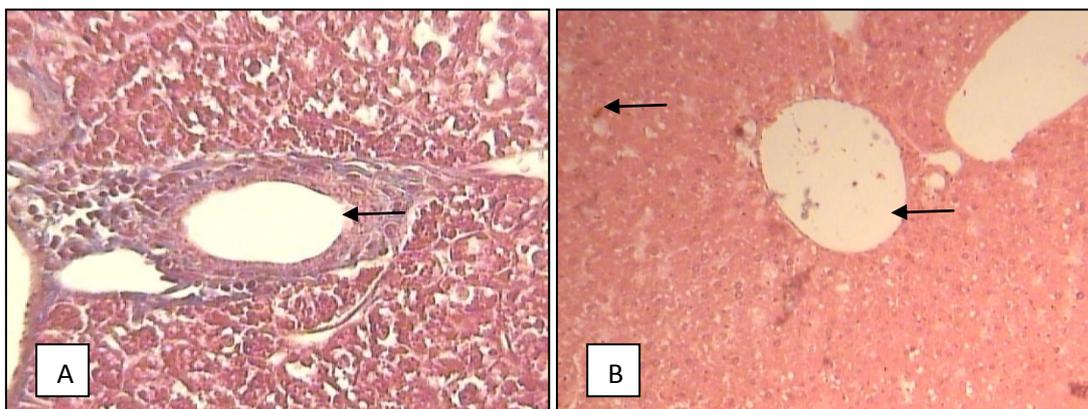


Figura 10- Fotomicrografia do fígado de animais do grupo II (Aumento 10x, TM em A e HE em B), seta apontando o espaço porta, células de Kupfler, veias e artérias.

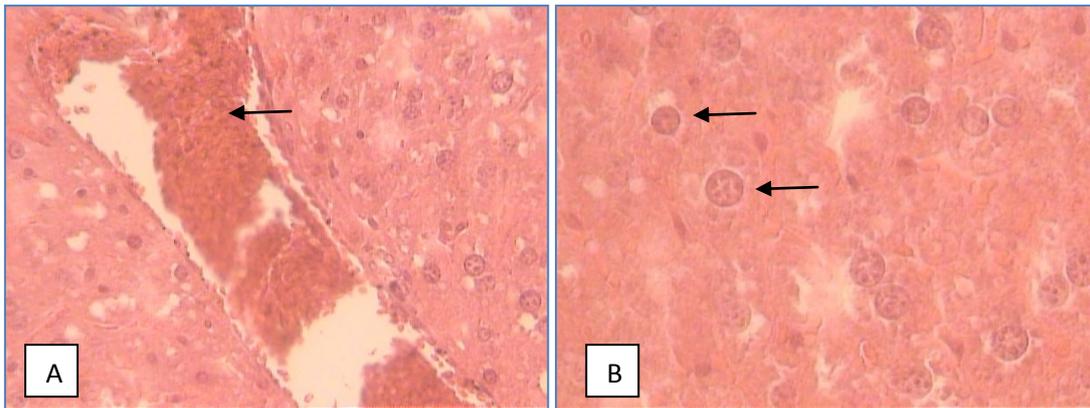


Figura 11- Presença de hemáceas congestionadas em A, vacúolos no citoplasma e hepatócitos de tamanhos variados e perda de núcleo em B. Fotomicrografia de animais do grupo III. (Aumento 40x, HE).

Não podemos deixar de citar a ausência de esteatose, uma vez que geralmente é o achado histológico mais comum. Dentre outras, também podemos afirmar que não houve alterações na produção de fibras colágenas, outra característica comum em se tratando do órgão em questão.

O acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos tem por finalidade estocar energia para momentos de necessidade, trata-se de um processo natural, onde a energia acumulada é muito maior do que no açúcar e proteínas. O fígado apresenta células estreladas que tem por função controlar os níveis de colesterol, levando o excesso de gorduras do sangue para o seu interior. Para isso existem dois estoques de energia, um armazenando a gordura (triglicérides) e outro para o glicogênio, que será transformado em glicose caso falte alimento ao organismo. Porém em excesso pode acarretar em uma doença metabólica, denominada esteatose hepática, onde o organismo reage contra os hepatócitos com acúmulo de gordura, destruindo-os gradativamente devido processo inflamatório. Muitas vezes essa reação pode levar ao aparecimento de fibrose, que pode levar a formação de nódulos caracterizando cirrose, que representa o estágio final de diversas doenças hepáticas crônicas e é caracterizada pela presença de fibrose e conversão da arquitetura hepática normal em nódulos estruturalmente anormais (BRANDÃO, et al., 2006).

Certos medicamentos e toxinas também podem desencadear um processo inflamatório e degeneração gordurosa no órgão, por ocasionar lesões nas mitocôndrias do fígado, dificultando a metabolização adequada de gorduras.

É no fígado onde ocorre a metabolização de drogas e detoxificação, portanto a hepatotoxicidade em estudos pré-clínicos é um desafio para uso terapêutico de novas drogas. Lesões neste órgão vital inviabilizam a adoção de novas terapias que poderiam ser eficazes no tratamento de diferentes doenças (FOLGUEIRA; BRENTANI, 2004).

Os pulmões representam a maior área de contato do corpo humano com o meio externo, contendo cerca de 300 milhões de alvéolos e mobilizando um volume de cerca de 10.000-15.000 litros de ar por dia (DANEL, 1996; WEST, 1996).

A histologia pulmonar apontou macrófagos circundantes, áreas de fibrose, alvéolos espessos e congestão celular.

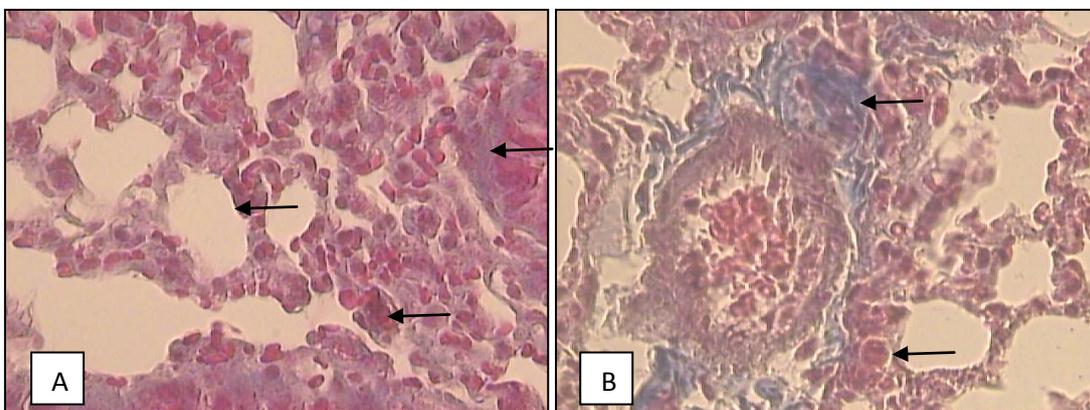


Figura 12- Fotomicrografia de pulmão de um animal do grupo III. Alvéolos pulmonares em A, septos espessados, macrófagos no espaço alveolar. Em B, congestão vascular e áreas de fibrose.

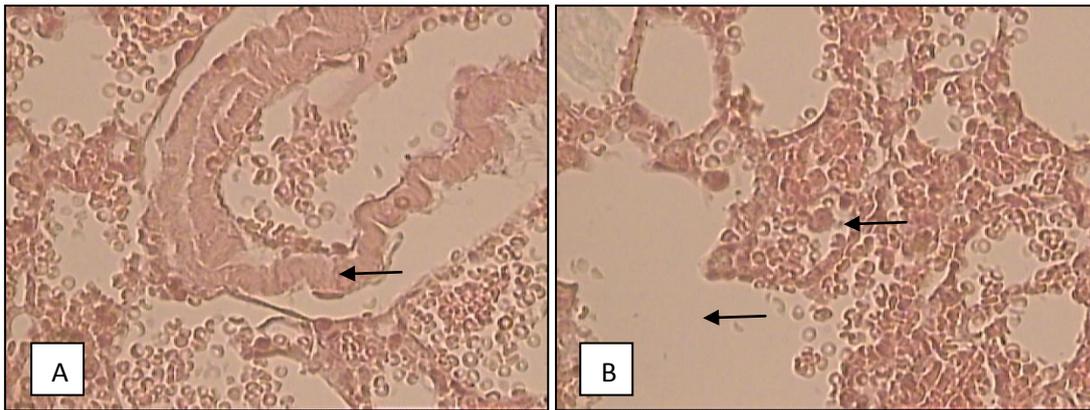


Figura 13- Fotomicrografia de pulmão (HE, 40X). Em A, seta mostrando mucosa e congestão celular. Em B, seta apontando o lúmen do brônquio e congestão celular nos sacos alveolares.

As causas de lesões das vias aéreas são múltiplas, variando tanto em sua natureza quanto em seu efeito. O trato respiratório responde a esses diferentes agentes por meio de reações inflamatórias acompanhadas de proliferação celular (CHRÉTIEN; NÉBUT, 1996).

A serotonina, produzida pelas plaquetas, é um importante mediador humoral liberado pela isquemia dos ácinos. São responsáveis pela broncoconstrição, diminuição da produção de surfactante e atelectasia e formação de exsudato alveolar. Estas áreas com broncoconstrição intensa e presença de exsudato nos alvéolos recebem perfusão sanguínea pobre em oxigênio. Acontece da ventilação ser insuficiente devido a diminuição do lúmen do brônquio e o sangue passar de um lado a outro sem receber oxigênio, um mecanismo responsável pela hipoxemia pulmonar.

Alguns processos inflamatórios acontecem quando macrófagos e células T são constantemente ativados, levando ao seu acúmulo nos sítios de lesão e significativo dano tecidual. As citocinas liberadas pelos macrófagos cronicamente ativados estimulam a proliferação de fibroblastos, levando ao aumento da produção de colágeno que culmina na fibrose, característica das inflamações crônicas (BILATE, 2007).

CONCLUSÕES

Após análise, pode-se concluir que houve alterações morfológicas causadas pela acetona cianidrina do tipo lesão celular e que levam a apoptose, bem como adaptação celular caracterizadas por degeneração dos túbulos renais e diminuição do tamanho e número dos glomérulos nos rins.

No pulmão áreas de fibrose, presença de macrófagos no espaço alveolar, septos espessados e desorganização estrutural.

No fígado desorganização generalizada na estrutura, hepatócitos de tamanhos variados e perda de núcleo.

No coração presença de células adiposas, hemorragia e fibrose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A. de; SILVA, O.A. da; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R.J. dos; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, 1986; p. 220-227.

AMINLARI, M., MALEKHUSSEINI, A., AKRAMI, F., EBRAHIMNEJAD, H. Cyanide-metabolizing enzyme rhodanese in human tissues: comparison with domestic animals. Comparative Clinical Pathology, 2007; 16:47-51.

BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. Temas de Reumatologia Clínica- vol. 8- n. 2- junho de 2007.

BRANDÃO, D. F., RAMALHO, L.N.Z., RAMALHO, F. S., ZUCOLOTO, S., MARTINELLI, A. L. C., CASTRO e SILVA, O. Acta Cirúrgica Brasileira; volume 21, pag. 54-57. 2006. Cirrose hepática e células estreladas do fígado.

CAVALCANTI, J., ARAÚJO, G.G.L. Parte aérea da mandioca na alimentação de ruminantes na região semi-árida. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido, 2000; 22p. (Embrapa Semi-Árido. Circular Técnico, N 57).

CHRÉTIEN. J., NÉBUT, M. Environmental injuries of the airway: overview of mechanisms and pathology. In: Environmental Impact on the Airways. From Injury to Repair. CHRÉTIEN, J & DUSSER, D., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, vol.93, cap.1.

DANEL, C.J. Morphological characteristics of human airway structures: diversity and unity. In: Environmental Impact on the Airways. From Injury to Repair. CHÉTIEN, J & DUSSER, D., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, vol.93, cap.2.

FOLGUEIRA, M. A. A. K; BRENTANI, M. M. Câncer de mama. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. Oncologia molecular. Editora Atheneu, São Paulo, 2004; p. 135-144.

FREEMAN, B.M. Physiology and biochemistry of the domestic fowl. London : Academic, 1984. 434p

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. Rev. Bras. Cancerologia 2007; 53 (3): 335-343.

IDIBIE, C. A., DAVIDS, H., IYUKE, S. E. Cytotoxicity of purified cassava linamarin to a selected cancer cell lines. Bioprocess Biosyst Eng. 2007;30:261-9.

ICIEK, M. L. WLODEK. Biossíntese e propriedades biológicas dos compostos contendo altamente reactivo, reduzir o enxofre sulfane. Pol J Pharmacol 2001; 53: 215-25.

JAENISCH, F. R. F. CUCCHI, V., BITENCURT. G., BARONI JR, W., SONCINI, R. A. Ciência rural, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 633- 638, mai-jun, 2005.

JUNQUEIRA, C.L., CARNEIRO J.: Histologia Básica, 10ª Edição, Ed. Guanabara Koogan, 2004, 324-334

KAMALU, B.P. The adverse effects of long-term cassava (*Manihot esculenta* Crantz) consumption .Vol. 46, No. 1. 1995; Pages 65-93.

KOUSPAROU, C. A., EPEMETOS, A. A., DEONARAIN, M. P. Anticorpo-enzima guid de câncer de produzir resultado cianeto em necrose de células targed. Int J Cancer. 2002; 99:138-48.

McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. Bases da Patologia em Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476p.

MAXWELL, M.H. et al. Hematological and morphological responses of broiler chicks to hypoxia. Avian Pathology, v.19, p.23-40, 1990.

MAXWELL, M.H. et al. Hematological and morphological changes in young broiler chicks with experimentally induce hypoxia. Research in Veterinary Science, v.43, p.331-338, 1987.

MILLER, O. Diagnóstico e terapêutica em Medicina Interna. Enciclopédia médica da Família. Editora: Livraria Civilizações Editora, 2001.

NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. Nature. 2000;407:810-16.)

OECD. Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.doi: 10.1787/9789264070981-en) 1996.

ONCOSINOS, Clínica de Oncologia.
<http://www.oncosinos.com.br/informacoes/quimioterapia.asp> Acessado em abril de 2012.

RAFFERTY JA, HICKSON I, LASHFORD LS, MARGISON GP, DEXTER TM, FAIRBAIRN LJ. Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. Cancer Metast Rev 15: 365-383, 1996

RAMALHO, R. T.; AYDOS, R. D; CEREDA, M. P.. Evaluation of acetone cyanohydrin effect in "*in vitro*" inactivation of the Ehrlich ascites tumor cells . Acta Cir. Bras. vol.25 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2010

WEST, J.B. Estrutura e função. In: Fisiologia Respiratória Moderna. Ed. Manole Ltda, 1996, 5a ed., p. 1-10.