

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DO MALEATO DE SUNITINIBE E DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA
NA MICROANGIOARQUITETURA DO CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER SÍRIO**

VINÍCIUS FACCIN BAMPI

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Medicina, da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Laura Beatriz Oliveira de Oliveira

Coorientador: Alois Lametschwandtner

Porto Alegre

2014

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 CÂNCER ORAL	5
1.2 ANGIOGÊNESE NO TUMOR.....	5
1.3 OS TIPOS DE ANGIOGÊNESE	5
1.4 REGULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE	7
1.4.1 Promotores endógenos da angiogênese	7
1.4.2 Inibidores endógenos da angiogênese	9
1.5 TÉCNICA DE MOLDES DE CORROSÃO VASCULAR	9
1.6 MORFOMETRIA EM MOLDES DE CORROSÃO VASCULAR.....	10
1.7 MODELO ANIMAL DE CÂNCER ORAL.....	12
1.8 TERAPIAS ANTIANGIOGÊNICAS	13
1.8.1 Drogas inibidoras dos receptores de tirosina-quinase (RTK).....	13
1.8.2 Quimioterapia Metronômica	15
1.9 NORMALIZAÇÃO VASCULAR	16
2 CONCLUSÃO	18

RESUMO

O câncer oral está entre os seis tipos mais comuns de câncer no mundo, sendo o sétimo mais encontrado entre a população brasileira. O processo de angiogênese tumoral tem-se tornado um alvo promissor para o tratamento de neoplasias malignas. Os métodos que permitem a avaliação tridimensional da angioarquitetura dos tumores são de grande importância na análise dos efeitos de tratamentos antiangiogênicos. Este trabalho visou avaliar o efeito do tratamento com sunitinibe e da quimioterapia metronômica com ciclofosfamida na vasculatura do carcinoma oral de células escamosas, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de réplicas vasculares. Assim, 24 hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) divididos em três grupos de oito animais cada, tiveram suas bolsas jugais direitas submetidas à indução tumoral com dimetilbenzantraceno e peróxido de carbamida por 55 dias, sendo mantidos por mais 4 semanas sem tratamento (grupo I), ou recebendo sunitinibe (grupo II), ou ciclofosfamida (grupo III). Após o tratamento, seis animais de cada grupo tiveram suas redes vasculares moldadas pela resina Mercocox® e analisadas qualitativa e quantitativamente em MEV. Os dois animais restantes de cada grupo tiveram suas bolsas qualitativamente analisadas em microscopia de luz. Foram observadas modificações na angioarquitetura das bolsas que receberam tratamento com os dois fármacos, o que gerou uma normalização da vascularização dos tumores. As principais modificações provocadas pelos tratamentos foram a redução da tortuosidade dos vasos, o reestabelecimento da hierarquia vascular, além da diminuição de imagens de sprouting e intussuscepções, vasos comprimidos, dilatações saculares e outras figuras vasculares. A análise quantitativa das amostras evidenciou uma redução estatisticamente significativa do diâmetro vascular e das distâncias intervasculares nas bolsas tratadas com ciclofosfamida, quando comparadas com as bolsas que não receberam tratamento e com aquelas tratadas com sunitinibe. Os achados do presente estudo sugerem que essas duas drogas podem atuar na normalização da rede vascular no carcinoma de células escamosas induzido em bolsa jugal de hamster; no entanto a quimioterapia metronômica apresentou resultados superiores.

Palavras-chave: *Mesocricetus auratus*, câncer oral, DMBA, molde por corrosão, microscopia eletrônica de varredura, inibidores da angiogênese

ABSTRACT

Oral cancer is among the six most common types of cancer worldwide, considered as the seventh most frequent in the Brazil. Tumor angiogenesis has become a promising target for the treatment of malignancies. Methods that allow three-dimensional evaluation of the vascular network of tumors have a great importance to assess the effects of antiangiogenic treatments in tumors. The objective of this study was to evaluate the effect of sunitinib maleate and the metronomic chemotherapy with cyclophosphamide on the vascular network of the oral squamous cell carcinoma by scanning electron microscopy (SEM) of corrosion casts. 24 Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) were divided into three groups of eight animals each and had their right buccal pouches submitted to tumor induction with dimethylbenzanthracene and carbamide peroxide for 55 days. Following, the animals were maintained without treatment (group I) or receiving sunitinib (group II), or cyclophosphamide (group III) for a period of 4 weeks. After the treatment, six animals of each group had their vascular networks casted by Mercocox® resin and analyzed qualitatively and quantitatively by SEM. The two remaining animals of each group had their buccal pouches prepared for qualitative analysis by light microscopy. It was observed changes in the angioarchitecture of the pouches that were treated with these two drugs, suggesting an improvement in the tumors vascularization. The main changes caused by the treatments were the reduction of vessel tortuosity, the reestablishment of vascular hierarchy, besides the decrease of sprouting and intussusception images, compressed vessels, saccular dilations, and other vascular figures. Quantitative analysis of the samples exhibited a statistically significant reduction in vascular diameter and intervascular distances of the pouches treated with cyclophosphamide, when compared with the pouches no treated and those treated with sunitinib. The findings of the present study suggest that these two drugs may act in the vascular normalization of squamous cell carcinomas induced in hamster buccal pouch, however the metronomic chemotherapy exhibited superior results.

Keywords: *Mesocricetus auratus*, oral squamous cell carcinoma, DMBA, corrosion casting, scanning electron microscopy, angiogenesis inhibitors

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER ORAL

O câncer oral está entre os seis tipos mais comuns de câncer no mundo. É o sétimo tipo mais encontrado na população brasileira, sendo esta a maior incidência entre os países da América Latina. Os carcinomas orais possuem uma alta taxa de fatalidade. Aproximadamente 70% dos pacientes tratados, quando o diagnóstico é feito antes da ocorrência de metástase, alcançam cinco anos de sobrevivência livre da doença. Essa taxa varia de 30% a 50%, se a detecção é feita quando já existem metástases (Losi-Guembarovski *et al.*, 2009).

A falta de marcadores precoces específicos e a apresentação clínica tardia são alguns dos obstáculos no diagnóstico do câncer bucal (Mognetti, Di Carlo e Berta, 2006). Devido a esses entraves, o prognóstico geral de câncer bucal não melhorou significativamente ao longo das últimas quatro décadas (Greenlee *et al.*, 2000).

1.2 ANGIOGÊNESE NO TUMOR

Sabe-se, atualmente, que a maioria dos tumores humanos surge sem atividade angiogênica, mantendo-se como neoplasias *in situ* durante meses e até anos (Carmeliet, 2005). Ao longo deste tempo, somente uma pequena porcentagem adquire fenótipo angiogênico, que lhe permite crescimento e metastização (Mcdonnell *et al.*, 2000).

1.3 OS TIPOS DE ANGIOGÊNESE

A palavra angiogênese sugere a formação de novos segmentos vasculares a partir de vasos existentes, tais como vasos capilares e vênulas (Risau, 1997).

Podem ser descritos dois mecanismos distintos de angiogênese: a angiogênese por *sprouting* (Risau, 1997) e a angiogênese por intussuscepção (Caduff, Fischer e Burri, 1986).

A angiogênese por *sprouting* (brotamento) consiste na formação de um broto vascular através da proliferação e de migração de células endoteliais de um vaso pré-existente. O processo inicia-se com degradação da membrana basal do vaso e subsequente escape das células endoteliais para a matriz extracelular. Em sequência, ocorre uma proliferação dessas células, formando um broto vascular que irá se conectar aos vasos vizinhos (Risau, 1997).

Este modo de angiogênese tem a grande vantagem de ser invasiva e, assim, de ser capaz de preencher lacunas vasculares, como, por exemplo, na cicatrização de ferimentos. Contudo, é um processo relativamente lento que depende essencialmente de proliferação das células endoteliais (Burri, Hlushchuk e Djonov, 2004).

O outro mecanismo de angiogênese, a intussuscepção, refere-se ao processo pelo qual um único capilar se divide longitudinalmente em dois pela formação de um septo. Nesse caso, as células endoteliais de lados opostos do vaso se estendem intraluminalmente até entrarem em contato, formando um septo ou pilar, levando ao surgimento de dois vasos (Caduff, Fischer e Burri, 1986).

A intussuscepção é rápida, ocorrendo dentro de horas, ou até mesmo de minutos, não necessitando inicialmente de proliferação celular (Burri, Hlushchuk e Djonov, 2004). Os pilares da angiogênese por intussuscepção podem ser vistos em vasos capilares e em pequenas artérias e veias com diâmetros de até 120 μm (Burri, Hlushchuk e Djonov, 2004).

Dependendo da localização da inserção do pilar, os resultados morfológicos e funcionais serão diferentes. O processo de formação do pilar na intussuscepção desempenha um eminente papel no remodelamento da árvore vascular, podendo estar relacionado tanto ao crescimento, quanto à poda vascular (Djonov *et al.*, 2000).

1.4 REGULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE

Tão importante quanto a proliferação vascular, quando há aumento das necessidades de oxigênio e de nutrientes, é a involução deste processo, que ocorre após a resolução de uma demanda adicional, com a regressão dos vasos neoformados. Dessa forma, é evitado que haja um aporte excessivo de oxigênio que, além de desnecessário, poderia conduzir a um estresse oxidativo e à formação de radicais livres de oxigênio, nefastos para os tecidos (Semenza, 2002).

Nesse contexto variável, o mecanismo angiogênico parece atuar como uma balança, em que, de um lado estão os ativadores (pró-angiogênicos), e de outro os inibidores (angiostáticos). É do resultado desse balanço que sobrevém um maior ou menor estímulo para a proliferação vascular. Em muitas patologias, a exemplo dos tumores, psoríase e retinopatia diabética, há uma desregulação desse balanço, ocorrendo uma resposta em cascata que estimula a formação de novos vasos sanguíneos (Bergers e Benjamin, 2003).

1.4.1 Promotores endógenos da angiogênese

Citam-se como promotores endógenos da angiogênese o fator de crescimento fibroblástico (*Fibroblastic Growth Factors*–FGF); o fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factors*–VEGF); o fator de crescimento derivado de plaqueta (*Platelet-derived Growth Factor*– PDGF), o fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor Alpha* - TNF α), além de outros fatores de crescimento derivados de plaquetas, como as prostaglandinas, a angiotensina e a heparina (Brat e Van Meir, 2001).

A ação harmoniosa, complementar e coordenada dessas moléculas formam os vasos sanguíneos e linfáticos funcionais (Daniel e Abrahamson, 2000).

Dentre as inúmeras moléculas indutoras da angiogênese, destaca-se a família do VEGF. Esta consiste em seis membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PIGF (*Placental Inducible Growth Factor*). Cada um desses fatores apresenta uma especificidade variável a três diferentes receptores chamados de

VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Paralelamente, estão identificados alguns receptores acessórios como as neurofilinas, que modulam a ligação àqueles outros três receptores supracitados (Shibuya *et al.*, 2001).

Embora tenha ação predominante na estimulação da angiogênese, o VEGF forma apenas vasos imaturos, não funcionais e instáveis (McMahon, 2000). O VEGF-A interage com ambos VEGFR-1 e VEGFR-2, mediando uma gama de efeitos biológicos sobre diversos tipos de células, além das células endoteliais (Saranadasa e Wang, 2010). O VEGF-B, -C, -D, -E, e PlGF, entretanto, possuem funções limitadas na biologia do câncer.

O VEGFR-2 é o principal mediador dos efeitos do VEGF no crescimento e na permeabilidade dos vasos. Já o VEGFR-1 pode ter um papel negativo, suprimindo a sinalização pelo VEGFR-2 (Bernatchez, Soker e Sirois, 1999). O VEGFR-3, o qual está presente essencialmente nos vasos linfáticos e vem sendo relacionado com a proliferação desses, tem grande afinidade pelo VEGF-C (Shibuya *et al.*, 2001).

O VEGF é um dos principais fatores pró-angiogênicos que iniciam a angiogênese tumoral. Esse fator desencadeia a proliferação e a sobrevivência das células endoteliais (Nicosia, Nicosia e Smith, 1994), aumenta a expressão de proteases e metaloproteinases (Pepper *et al.*, 1991) e altera a expressão de moléculas de adesão (Melder *et al.*, 1996). O efeito do VEGF permite a criação de um ambiente favorável à degradação da matriz extracelular, facilitando a migração e o brotamento das células endoteliais.

A ativação do VEGF também aumenta a permeabilidade microvascular, acarretando o vazamento de proteínas plasmáticas e o estabelecimento de um gel extravascular de fibrina que serve de substrato para o crescimento das células endoteliais (Dvorak *et al.*, 1987). A superprodução desse fator angiogênico potente tem sido apontado como um dos principais fatores responsáveis pela manutenção da elevação da permeabilidade vascular nos tumores (Dvorak *et al.*, 1999).

As alterações na morfologia da rede vasculares dos tumores tem sido atribuídas à expressão acentuada de VEGF e, com menor efeito, de outros fatores de crescimento durante a expansão das neoplasias malignas. O VEGF pode causar o desenvolvimento de vasos dilatados e sinuosos, com conexões e ramificações aleatórias (Dvorak *et al.*, 1995; Lichtenbeld *et al.*, 1999).

1.4.2 Inibidores endógenos da angiogênese

Os inibidores endógenos da angiogênese são moléculas cuja síntese laboratorial está em franca expansão, sendo identificadas inúmeras aplicações terapêuticas (Ferrara e Kerbel, 2005). Entre as moléculas mais importantes, salientam-se a angiostatina, a endostatina e a antitrombina III (Reynolds e Redmer, 1998).

Vários ensaios clínicos demonstraram que certos tumores poderiam produzir inibidores angiogênicos (Carmeliet, 2005). Esse fenômeno explicaria porque, em certas cirurgias, após a remoção do tumor principal (carcinomas do cólon e da mama e sarcomas osteogênicos), havia rápido desenvolvimento de metástases à distância (Folkman, 2006).

Há relatos de que os fatores inibidores provêm da ação enzimática de metaloproteinases em proteínas comuns. Assim, a angiostatina resulta da degradação do plasminogênio e a endostatina do colágeno XVIII. Logo, ambas as moléculas, reconhecidamente importantes na inibição do processo angiogênico, estão sendo usadas em múltiplos ensaios clínicos na área da oncologia (Soff, 2000).

1.5 TÉCNICA DE MOLDES DE CORROSÃO VASCULAR

A técnica de moldes de corrosão vascular associada à microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido aplicada no estudo do padrão vascular de órgãos e de tecidos normais, de processos patológicos e de estruturas em desenvolvimento (Lametschwandtner, Lametschwandtner e Weiger, 1990). Os modelos vasculares desses órgãos e de tecidos são obtidos pela moldagem do lúmen dos vasos com uma resina de baixa viscosidade, seguida pela corrosão, com solução alcalina, do tecido circunjacente à resina polimerizada (Piette e Lametschwandtner, 1994; Kronka, Watanabe e Da Silva, 2001).

O estudo dos vasos, através de moldes de corrosão vascular, complementa e diminui as carências entre as imagens histológicas bidimensionais (2D), obtidas pela

microscopia de luz, e o arranjo tridimensional (3D) da angioarquitetura. As réplicas vasculares, quando analisadas por MEV, fornecem informações estruturais sobre a rede vascular, livres de qualquer tecido que a circunda, independentemente do local que está sendo estudado (Murakami, 1971; Lametschwandtner, Lametschwandtner e Weiger, 1990).

A rede vascular do tumor é de grande importância como um dos alvos da terapia tumoral (Qayum *et al.*, 2009), além de um biomarcador de prognóstico (Minardi *et al.*, 2008; Yildiz *et al.*, 2008). Métodos que permitem uma análise tridimensional da vasculatura tumoral, como a técnica de corrosão vascular, possuem um papel importante para o entendimento da biologia da vascularização das neoplasias (Belien, Van Diest e Baak, 1999) e também na avaliação dos efeitos de tratamentos anticâncer (Tozer, 2003; El Emir *et al.*, 2007).

1.6 MORFOMETRIA EM MOLDES DE CORROSÃO VASCULAR

A demonstração da origem, do trajeto e das ramificações dos vasos, tanto nas áreas de suprimento quanto de drenagem, pode ser revelada com precisão de detalhes pela técnica de corrosão vascular associada à MEV (Lametschwandtner, Lametschwandtner e Weiger, 1990).

Muitos trabalhos empregam a técnica de corrosão vascular para analisar a angioarquitetura de tecidos e de órgãos em condições normais e patológicas, entretanto, boa parte desses usa as imagens obtidas através da MEV apenas para descrever a rede vascular (Konerding, 1991; Romanowska-Dixon *et al.*, 2001; Rossi-Schneider *et al.*, 2008).

O estudo morfométrico de modelos de corrosão vascular possibilita calcular os parâmetros associados com a arquitetura microvascular, tais como os diâmetros dos vasos e as distâncias entre eles (Minnich *et al.*, 1999). Isso é de grande importância quando se pretende determinar a vascularização característica de tumores e os efeitos de fármacos que atuam na rede vascular das neoplasias (Konerding, Miodonski e Lametschwandtner, 1995; Konerding *et al.*, 1999).

A medida de parâmetros vasculares, como as distâncias intervasculares e o diâmetro vascular, torna-se somente possível quando informações espaciais sobre o molde de corrosão vascular são consideradas. Em uma análise bidimensional, necessita-se de duas coordenadas para cada ponto (X; Y), porém, em análises tridimensionais, necessita-se de três (X; Y; Z), sendo a terceira coordenada a profundidade do conjunto (Konerding *et al.*, 1999).

Um método adequado para obter essas informações é a reconstrução 3D de imagens estereopareadas com um ângulo de inclinação determinado. Para que seja possível a obtenção de imagens estereopareadas, é necessária uma modificação nos padrões de aquisição das imagens na MEV. São adquiridas duas imagens do mesmo local, com um intervalo angular de geralmente 6° ou 8° entre as mesmas (Gegler, Gazolla e Souza, 2008).

A obtenção de dados quantitativos sobre moldes de corrosão é possível através da correção das medidas obtidas em imagens estereopareadas, por meio de algoritmos específicos. Dessa forma, Kratky e Roach (1987) propuseram a utilização do princípio da paralaxe para a obtenção de pontos no terceiro plano da imagem.

Malkusch, *et al.*, 1995, extrapolaram os estudos de Kratky e Roach (1987) para análise quantitativa de moldes de corrosão de tumores. Esses autores observaram que o estabelecimento das coordenadas dos pontos nos três planos da imagem permitiria a aplicação do sistema de Pitágoras para a obtenção de medidas lineares e angulares em modelos de corrosão.

A partir do sistema desenvolvido por Malkusch *et al.* (1995), diversos estudos têm sido realizados empregando esse sistema de análise quantitativa em moldes de corrosão vascular de tumores, tanto em modelos experimentais (Dimitropoulou *et al.*, 1998; Konerding *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2004) quanto em humanos (Fait *et al.*, 1998; Folarin *et al.*, 2010).

Um exemplo da aplicação dessa técnica de morfometria foi o estudo realizado por Silvan *et al.*, 2009, os quais avaliaram, em réplicas vasculares de corrosão, as distâncias intervasculares e o diâmetro dos capilares da rede vascular do teratocarcinoma de células tronco embrionárias, transplantadas para os túbulos seminíferos. Nesse estudo, os autores relataram que os dados obtidos com as

distâncias intervasculares foram consideradas um parâmetro indicativo da densidade vascular, equiparando-os com a densidade microvascular calculada em estudos bidimensionais.

Minnich *et al.* (1999), desenvolveram um *software* (3D-morphometry, ComServ, Salzburg, Áustria) para análise de imagens estereopareadas, baseado no princípio da paralaxe. O *software* permitia o cálculo das coordenadas espaciais e as distâncias derivadas de uma forma automatizada, exibindo um erro no valor das mensurações menor do que 1,0%. Em 2012, esse programa foi atualizado, passando a apresentar uma navegação mais acessível e uma compatibilidade com todos os sistemas operacionais atualmente disponíveis (Minnich *et al.*, 2012).

1.7 MODELO ANIMAL DE CÂNCER ORAL

O hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) é um roedor da família Cricetidae. Esse animal possui bolsas jugais ou faciais altamente distensíveis que são divertículos bilaterais das mucosas jugais, as quais se estendem sob a pele, da extremidade posterior da comissura labial até aproximadamente o nível das escápulas do animal. O epitélio da parede da bolsa é similar à pele humana, sendo denominado “pele sem folículos e glândulas” (Duling, 1973).

A bolsa jugal do hamster é um excelente órgão para o estudo de carcinoma da mucosa oral, visto que é susceptível a modificações por uma variedade de influências locais e sistêmicas (Gijare, Rao e Bhide, 1990), sendo um dos modelos usados nas pesquisas de câncer oral (Mognetti, Di Carlo e Berta, 2006).

O composto 9,10 dimetilbenzantraceno (DMBA), agente carcinogênico, induz uma resposta hiperplásica no epitélio da bolsa após poucas aplicações (Santis, Shklar e Chauncey, 1964). A carcinogênese química, na bolsa jugal de hamster com DMBA, possui uma relação íntima entre os eventos celulares e moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas em seres humanos, como mutações e alteração na expressão de oncogenes e em marcadores de proliferação celular (Vairaktaris *et al.*, 2008).

O peróxido de carbamida a 10%, quando em contato com a saliva, dissocia-se em 3,6% a 5% de peróxido de hidrogênio e 6,4% a 7% de ureia (Hummert *et al.*, 1993). O peróxido de hidrogênio presente no peróxido de carbamida, por sua vez, dissocia-se em oxigênio e água, quebrando-se posteriormente e liberando radicais livres (Hays *et al.*, 1995). A presença desses radicais livres pode ser nociva pelo fato de que os ânions superóxidos e os íons hidroxila liberados são radicais oxidantes altamente reativos e tóxicos.

Os radicais livres agem diretamente nos componentes vitais das células, podendo danificar membranas celulares, alterar o ADN e as proteínas (Cherry *et al.*, 1993). Devido a essas características, o peróxido de carbamida pode ser considerado um agente promotor da carcinogênese.

1.8 TERAPIAS ANTIANGIOGÊNICAS

A importância central da angiogênese e da compreensão de como os novos vasos sanguíneos se formam durante a expansão dos tumores levou ao desenvolvimento de novas terapias destinadas a interromper esse processo. Embora os compostos antiangiogênicos tenham sido recentemente incorporados à clínica, eles anunciam uma nova era, em que a biologia do tumor é a base para a terapêutica do câncer.

Os fármacos antiangiogênicos usados para o tratamento de neoplasias malignas atuam em vasos repletos de alterações, compreendendo aberrações em sua morfologia e modificações na composição estrutural de suas paredes (Konerding *et al.*, 1999). O estudo da ação desses fármacos sobre a morfologia dos vasos tumorais contribui para uma melhor compreensão do mecanismo de ação dessas terapias.

1.8.1 Drogas inibidoras dos receptores de tirosina-quinase (RTK)

Os receptores de tirosina-quinase (RTKs) são uma subclasse de receptores de fatores de crescimento, localizados na superfície celular, com atividade tirosina-

quinase ligante-controlada. Os receptores tirosina-quinase têm um domínio extracelular para conexão com o ligante, um domínio transmembrana e um domínio catalítico intracelular. Quando um ligante (geralmente um fator de crescimento) se liga ao seu receptor, o domínio intracelular é ativado, desencadeando uma cascata de sinalização que resulta em eventos celulares (Lemmon e Schlessinger, 2010). A superexpressão ou a mutação de fatores de crescimento e a ativação dos receptores de tirosina-quinase têm sido relacionados com o crescimento e com a metastização tumoral, assim como com o crescimento de vasos sanguíneos nos tumores (Hanahan e Weinberg, 2000).

Recentemente, drogas inibidoras dos receptores de tirosina-quinase têm sido aprovadas para o uso no tratamento de tumores sólidos. Esses agentes competem com o ATP pela ligação dentro do domínio intracelular de vários tipos de receptores de tirosina-quinase. Essas novas drogas tendem a apresentar uma toxicidade reduzida, quando comparadas com os agentes citotóxicos usados na quimioterapia, os quais apresentam uma interação não-específica com o ADN celular, causando danos em tecidos saudáveis (Faivre, Djelloul e Raymond, 2006).

O sunitinibe – formalmente conhecido como SU11248 – é um inibidor multi-alvo da tirosina-quinase, o qual apresenta efeitos antiangiogênicos e antitumorais devido, principalmente, à inibição seletiva dos receptores VEGFR-1, VEGFR-2, dos receptores α e β do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR α e PDGFR β) e do receptor do fator de crescimento de células tronco (c-KIT) (Faivre *et al.*, 2007).

Em oposição aos fármacos que apresentam um único mecanismo alvo para o bloqueio da angiogênese nos tumores, os agentes inibidores multialvo da tirosina-quinase atuam simultaneamente no tumor e em seu estroma, apresentando uma interação mais abrangente com o complexo multimolecular que permite o crescimento das neoplasias. Além disso, as terapias multialvo apresentam uma probabilidade menor de resistência, normalmente ocasionadas por mutações, superexpressões de fatores de crescimento e pela presença de rotas alternativas de sinalização (Faivre *et al.*, 2007).

O potencial do sunitinibe para o tratamento do carcinoma oral de células escamosas recorrente tem sido recentemente testado em estudos clínicos de fase II (Choong *et al.*, 2010; Machiels *et al.*, 2010). Esses estudos evidenciaram apenas

uma modesta ação do sunitinibe no controle da progressão das neoplasias orais, quando usado como monoterapia.

1.8.2 Quimioterapia Metronômica

Os agentes citotóxicos empregados na quimioterapia tradicional atuam em células em proliferação, causando danos, ou alterando o ADN durante a fase de replicação celular. Os protocolos convencionais para o tratamento do câncer com essas drogas visam a exterminar o maior número de células tumorais possíveis, sendo prescrita a máxima dose tolerada desses fármacos. Devido a seus efeitos colaterais, esse tipo de regime quimioterápico exige intervalos prolongados do tratamento entre os ciclos sucessivos da terapia.

Os efeitos colaterais da quimioterapia convencional ocorrem essencialmente devido ao uso de altas doses das drogas citotóxicas, provocando consequências como a queda de cabelo, até danos graves na mucosa intestinal e mielossupressão aguda. Além disso, doses altas desses agentes podem causar lesões irreversíveis nos sistemas cardíaco (Curigliano *et al.*, 2010), renal (Pabla e Dong, 2008), nervoso (Cavaletti e Marmioli, 2010) e reprodutivo (Kim, Klemp e Fabian, 2011).

Em 2000, Hanahan, Bergers e Bergsland (2000) criaram o termo metronômico para descrever um novo tipo de tratamento para o câncer. Esse termo faz referência a uma alteração no regime terapêutico, sugerindo o uso de drogas citotóxicas convencionais em doses menores, conseqüentemente menos tóxicas e com menos efeitos colaterais, por longos períodos de tempo, sem intervalos prolongados livres dessas drogas (Kerbel e Kamen, 2004).

Em oposição à quimioterapia convencional, o alvo terapêutico primário da quimioterapia metronômica são as células endoteliais da nova rede vascular formada pelo tumor em crescimento (Browder *et al.*, 2000). As drogas citotóxicas são empregadas nesse regime como agentes antiangiogênicos, o que redefine o alvo desse tipo de quimioterapia (Miller, Sweeney e Sledge, 2001).

Os possíveis mecanismos de ação anti-angiogênica da quimioterapia metronômica têm sido explicados através de duas rotas distintas: uma direta e uma

indireta. Na rota direta, as baixas doses dos agentes quimioterápicos atuam impedindo o crescimento e estimulando a apoptose das células endoteliais na neovasculatura do tumor. Ainda através da rota direta, essas drogas provocariam uma supressão sustentada da mobilização medular de células endoteliais progenitoras. Já a rota indireta estaria relacionada com a produção, pelas próprias células endoteliais, de uma molécula supressora da angiogênese e da vasculogênese denominada trombospondina-1 (Kerbel e Kamen, 2004).

A ciclofosfamida é um agente alquilante nitrogenado do grupo das oxazoforinas. O uso da ciclofosfamida por via oral, em baixas doses, isolada ou em combinação com outros agentes, tem sido o regime de quimioterapia metronômica mais estudado até os dias de hoje (Penel, Adenis e Bocci, 2011). O uso contínuo de baixas doses de ciclofosfamida em humanos tem sido estudado no tratamento de tumores sólidos, a exemplo de tumores metastáticos de próstata (Nelius *et al.*, 2010) e de mama (Bottini *et al.*, 2006), e em neoplasias hematológicas, como linfoma (Coleman *et al.*, 2008) e mieloma múltiplo (Zhou *et al.*, 2010).

A aplicação da quimioterapia metronômica apresenta outro importante benefício – o baixo custo. O gasto com tratamento das neoplasias malignas tem aumentado substancialmente na última década após a implementação de terapias alvo, a exemplo dos fármacos antiangiogênicos. Klement e Kamen, 2011 afirmam que a quimioterapia metronômica pode ser um método atrativo para melhorar a vida dos muitos pacientes que sofrem de câncer avançado ou sem nenhuma expectativa de cura, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Andre, Guercio e Pasquier (2013) reiteram que as vantagens desse regime para o tratamento dos tumores são: (a) o uso de drogas antigas e genéricas de baixo custo, (b) administração via oral, reduzindo os gastos com interações hospitalares e facilitando a acessibilidade dos pacientes que vivem longe de grandes centros urbanos e, (c) baixo risco de toxicidade, diminuindo a necessidade de avaliações de índices hematimétricos e terapia nutricional.

1.9 NORMALIZAÇÃO VASCULAR

A descoberta das vias de sinalização da angiogênese estimularam o desenvolvimento de terapias que visassem diminuir a vascularização de tumores malignos através do bloqueio do VEGF. Os primeiros estudos pré-clínicos evidenciaram uma redução do crescimento em tumores sólidos com o uso de um anticorpo monoclonal anti-VEGF (Kim *et al.*, 1993).

Devido aos excelentes resultados obtidos em estudos experimentais, a aplicação dessas terapias foi rapidamente aprovada para o tratamento de humanos. Entretanto, os ensaios clínicos exibiram que a monoterapia com fármacos antiangiogênicos apresentava uma modesta redução dos tumores ou melhora na taxa de sobrevida dos pacientes.

Jain (2001) observou que a associação da quimioterapia tradicional com terapias que supostamente reduziriam o aporte sanguíneo dos tumores era muito mais efetiva no tratamento de neoplasias malignas. Esses resultados contraintuitivos sugeriram que algum outro mecanismo de ação estaria envolvido com o bloqueio das vias de sinalização da angiogênese.

A teoria da normalização vascular dos tumores afirma que as terapias antiangiogênicas diretas ou indiretas reverteriam o desequilíbrio entre os fatores inibidores e ativadores da angiogênese. Dessa forma, a estrutura, a função e o fluxo sanguíneo desses vasos tornar-se-iam próximos ao normal, auxiliando numa distribuição mais uniforme de drogas anti-neoplásicas (Goel *et al.*, 2011).

Após a proposição da hipótese da normalização vascular, foi possível identificar a existência de uma janela de normalização vascular, dependente do tempo de tratamento e da dose dos antiangiogênicos. Segundo Jain (2005), a estratégia antiangiogênica deveria ser aplicada visando a poda de vasos imaturos e disfuncionais e a fortificação daqueles remanescentes, sem provocar dano na rede vascular normal. As doses excessivas ou prolongadas desses fármacos poderiam causar uma poda vascular muito rápida, exacerbando a necrose e a hipóxia tecidual, assim estimulando a progressão e metastização das neoplasias.

2 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a avaliação de réplicas vasculares obtidas por corrosão através microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta útil para o estudo das alterações morfológicas ocorridas na rede vascular das bolsas jugais de hamsters após a indução tumoral e o subsequente tratamento com drogas antiangiogências. Os achados aqui descritos forneceram evidências que suportam a teoria da normalização vascular, na qual o uso dos fármacos com efeito antiangiogênicos como o sunitinibe e a ciclofosfamida em regime metronômico normalizaria a rede vascular dos tumores através da poda de estruturas imaturas e da reordenação dos vasos persistentes.

A quimioterapia metronômica com ciclofosfamida demonstrou melhores resultados na normalização vascular do que os verificados com o fármaco sunitinibe, contribuindo, portanto, para que outras pesquisas sejam realizadas a fim de avaliar a eficácia desse método de baixo custo e de fácil acesso no tratamento do câncer ora

