

LAURA BEATRIZ OLIVEIRA DE OLIVEIRA

**ANGIOARQUITETURA DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS,
QUIMICAMENTE INDUZIDO EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER: ANÁLISE
EM MICROSCOPIA DE LUZ E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA DE RÉPLICAS VASCULARES**

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

Data de aprovação em 20 de janeiro de 2009

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo
.....

Prof. Dr. Leo Kraether Neto
.....

Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho
.....

Prof. Dr. Mônica Ryff M. Roca Vianna
.....

Porto Alegre

2009

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	18
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 VASCULOGÊNESE VERSUS ANGIOGÊNESE	20
1.2 REGULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE	21
1.3 PROMOTORES ENDÓGENOS DA ANGIOGÊNESE	21
1.4 INIBIDORES ENDÓGENOS DA ANGIOGÊNESE	24
1.5 ANGIOGÊNESE NO TUMOR	25
1.6 MODELO ANIMAL	27
1.7 AGENTES CARCINOGENICOS	29
1.7.1 DMBA, 9,10 dimetil benzatraceno (9, 10 <i>dimethyl-1, 2-benzathracene</i>)	29
1.7.2 Peróxido de Carbamida	30
1.8 TÉCNICA DE MODELO DE CORROSÃO VASCULAR	32
1.9 HIPÓTESE	34
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
CAPÍTULO 2 - HAMSTER SÍRIO DOURADO (<i>MESOCRICETUS AURATUS</i>) UM MODELO PARA ESTUDO DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	35
1 INTRODUÇÃO	38
1.1 CÂNCER BUCAL	38
1.2 MODELO ANIMAL	38
2 OBJETIVO	43
3 MATERIAIS E MÉTODO	43
3.1 ANIMAIS	43
3.2 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	44
3.3 PREPARO DOS AGENTES QUÍMICOS.....	44
3.4 APLICAÇÃO	45
3.5 EUTANÁSIA E ANÁLISE DOS ESPÉCIMES.....	45
4 RESULTADOS	46
5 DISCUSSÃO	47

REFERÊNCIAS.....	53
------------------	----

CAPÍTULO 3 - BOLSA JUGAL DE HAMSTER SÍRIO DOURADO (MESOCRICETUS AURATUS): ESTUDO COM MODELO DE CORROSÃO E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ASSOCIADA À MICROSCOPIA DE LUZ	58
1 INTRODUÇÃO	60
1.1 ANATOMIA E ARRANJO VASCULAR DA BOLSA JUGAL E DO MÚSCULO RETRATOR	61
2 OBJETIVOS DO TRABALHO	65
3 MATERIAIS E MÉTODO	65
3.1 PERFUSÃO COM RESINA ACRÍLICA	65
3.2 CORROSÃO VASCULAR	66
3.3 ANÁLISE DAS RÉPLICAS MICROVASCULARES	67
3.4 MICROSCOPIA DE LUZ	68
4 RESULTADOS	68
4.1 MICROSCOPIA DE LUZ	68
4.2 TÚNICA MUCOSA	69
4.3 TÚNICA MUSCULAR	70
4.4 TÚNICA ADVENTÍCIA	71
4.5 TECIDO CONJUNTIVO / VASOS SANGÜÍNEOS	71
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	72
4.6.1 Vasos arteriais	72
4.6.2 Vasos venosos	72
4.6.3 Capilares	73
5 DISCUSSÃO	75
REFERÊNCIAS	79
CAPÍTULO 4 - ARTIGO (submetido ao periódico <i>Oral Oncology</i>)	83
REFERÊNCIAS	98
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
5.1 HISTOLOGIA	101
5.2 INDUÇÃO QUÍMICA DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS – MODELO ANIMAL.....	103
5.3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	103
5.4 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BEM DIFERENCIADO	103

5.5 TÉCNICA DE CORROSÃO VASCULAR ASSOCIADA À MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	104
5.6 MICROSCOPIA DE LUZ E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	105
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	117
Anexo A - A oncologia de cabeça e pescoço da Grécia Antiga ao Século XX quando a avaliação histológica de tumores se tornou um padrão prático.....	118
REFERÊNCIAS	121
Anexo B - O animal experimental - hamster sírio dourado com bolsa jugal evidenciada	123
Anexo C - 2 nd International Workshop on advances in vascular casting	127
Anexo D – Ofício 055/08-CEUA	134

RESUMO

O câncer da cavidade bucal e o câncer orofaríngeo representam o 6º tipo mais comum de câncer no mundo, sendo que 90% desses tumores bucais são do tipo carcinoma de células escamosas. Para que ocorra o estabelecimento, a expansão e a metastatização de neoplasias é fundamental que tumores estimulem a produção de sua própria rede vascular, processo conhecido como angiogênese tumoral. Assim, o resultado é uma nova rede de vasos adequada ao crescimento e a viabilização de metástases. Os vasos do tumor são considerados como imaturos e diferem dos vasos normais, apresentando formas tortuosas, irregulares, revestidos por células endoteliais amplamente fenestradas e muitas vezes com ausência de membrana basal. Os objetivos deste trabalho foram: definir um protocolo para estudo da angioarquitetura em réplicas vasculares de tumores quimicamente induzidos na bolsa jugal de hamster sírio dourado *Mesocricetus auratus*, descrever a histologia do órgão normal por microscopia de luz (ML) e a angioarquitetura por microscopia eletrônica de varredura (MEV), analisar qualitativamente a rede vascular neoformada em bolsas jugais de hamster sírios após indução química de tumor em três tempos diferentes. 24 hamsters sírios machos e com cinco semanas de vida, divididos em três grupos de oito animais cada, tiveram suas bolsas jugais direitas tratadas três vezes por semana com dimetilbenzantraceno (DMBA) e duas vezes por semana com peróxido de carbamida por 55, 70 e 90 dias, respectivamente cada grupo. A bolsa esquerda foi isenta de tratamento e considerada como controle. Posteriormente à indução do tumor, cinco animais de cada grupo tiveram suas redes vasculares moldadas pela resina Mercocox® e analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os três animais restantes de cada grupo tiveram suas bolsas preparadas para análise em microscopia de luz (ML). Após 55 dias de indução tumoral, todos os espécimes analisados por ML já apresentavam carcinoma de células escamosas na bolsa jugal tratada e este resultado se consolidou aos 70 e 90 dias de tratamento. O menor tempo necessário para a indução tumoral comparado a estudos anteriores e o sucesso na produção do tumor em todos os animais submetidos ao tratamento foi correlacionado a ação do peróxido de carbamida e ao enriquecimento ambiental empregado durante o experimento. Foi possível concluir que o protocolo desenvolvido pode ser útil à análise da angioarquitetura dos tumores em bolsas jugais de hamster sírio. A técnica de MEV possibilitou diferenciar vasos arteriais de venosos, como também replicar estruturas como esfíncteres, bifurcações, anastomoses e sugerir a presença de sproutings. No estudo da bolsa jugal normal com ML foram evidenciadas três túnicas: a túnica mucosa, a túnica muscular e a túnica adventícia. Quando analisadas por MEV, as réplicas vasculares das bolsas controle apresentavam sua rede vascular composta por vasos paralelos ao seu maior eixo, conforme a fisiologia do órgão. Nas bolsas submetidas à indução tumoral observou-se a formação de uma nova rede vascular, com a presença de vasos tortuosos e paralelos. Durante a progressão do tumor houve perda do paralelismo vascular e um aumento do calibre dos vasos. Estruturas de angiogênese também foram observadas.

Palavras-chave: hamster sírio, bolsa jugal, DMBA, peróxido de carbamida, angioarquitetura, microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, carcinoma de células escamosas.

1 INTRODUÇÃO

Todas as células dependem de oxigênio e nutrientes para a sua sobrevivência. Essa necessidade implica em que as células se encontrem próximas a capilares sangüíneos, a uma distância que permita a difusão de oxigênio (DANIEL; ABRAHAMON, 2000).

A rede vascular basal é insuficiente em situações de aumento de consumo de oxigênio e nutrientes, como por exemplo, no crescimento e na regeneração tecidual. Para ultrapassar o déficit nestas situações, a vasodilatação, muitas vezes, não é suficiente, sendo necessária a formação de novos vasos sangüíneos. O processo de formação de novos vasos a partir dos pré-existentes denomina-se, genericamente, angiogênese (BECK JR.; D'AMORE, 1997; DANIEL; ABRAHAMON, 2000).

Sob circunstâncias fisiológicas controladas, a angiogênese é um processo normal e essencial. Entretanto, durante o processo de estabelecimento e propagação do câncer, a angiogênese permite que o tumor produza sua própria fonte de provimento sangüíneo para obter os nutrientes e o oxigênio. Assim, o resultado é uma rede de vasos adequada ao crescimento e a viabilização de metástases (FOLKMAN, 1998).

Fisiologicamente, este processo está presente no desenvolvimento embrionário e no crescimento ao longo dos primeiros anos. Na idade adulta, observa-se no aparelho reprodutor feminino a cada ciclo menstrual, na gravidez, na cicatrização de feridas e na seqüência de processos inflamatórios (POLVERINI, 2002; JAFFE, 2000).

Células endoteliais, que normalmente permanecem quiescentes, com *turnover* entre os 1000 e 5000 dias, em determinadas circunstâncias, emergem para estados de rápida proliferação, viabilizando a formação de novos vasos (DANIEL; ABRAHAMON, 2000; BECK JR.; D'AMORE, 1997).

Portanto, nas situações em que há aumento das necessidades de oxigênio e nutrientes, existe uma resposta fisiológica do organismo que aumenta a densidade da rede capilar. Essa resposta é minuciosamente regulada e tem uma duração limitada (POLVERINI, 2002; ZAKRZEWICZ; SECOMB; PRIES, 2002).

Há, porém, inúmeras situações patológicas em que o processo persiste descontroladamente durante meses ou anos. O exemplo mais conhecido é o do

tumor, em que a angiogênese é fundamental, para sustentar o crescimento tumoral e assim permitir a metastatização (POLVERINI, 2002).

Outros exemplos de desregulação da angiogênese são citados, tais como as doenças inflamatórias intestinais, as doenças de neovascularização ocular, a destruição de cartilagens na artrite reumatóide, o desenvolvimento de placa aterosclerótica, os hemangiomas infantis, a endometriose, a obesidade, entre outras (POLVERINI, 2002; GIBALDI, 1998; CARMELIET, 2005).

Ocorrem também múltiplas situações de processos isquêmicos, onde é útil a formação de novos vasos que possam suprir o déficit de oxigênio. Porém, muitas vezes, a proliferação vascular não é suficiente perante as necessidades, como no caso da doença arterial periférica, na coronariopatia, em patologias neurodegenerativas e em fraturas ósseas (POLVERINI, 2002; GIBALDI, 1998; CARMELIET, 2003).

1.1 VASCULOGÊNESE VERSUS ANGIOGÊNESE

A vasculogênese é o processo iniciado precocemente na vida embrionária, que origina os vasos de grande calibre, a partir de precursores mesodérmicos, os angioblastos (RISAU; FLAMME, 1995). A vasculogênese pode desempenhar um papel fundamental na organogênese (MATSUMOTO et al., 2001).

O termo angiogênese é muitas vezes empregado no seu sentido mais *lato*, como o mecanismo de proliferação de células endoteliais e musculares lisas para formar novos vasos sangüíneos. Em 1787, Hunter foi o pioneiro a usar o termo angiogênese (crescimento de novos vasos sangüíneos) para descrever o crescimento de vasos sangüíneos semelhantes a galhos de árvore.

Após a formação dos grandes troncos vasculares, os vasos ramificam-se e distribuem-se numa rede vascular complexa (CARMELIET, 2000). Os vasos neoformados surgem a partir de vasos preexistentes e este processo mantém-se durante toda a vida do indivíduo, respondendo sempre que necessário a alterações na demanda de oxigenação tecidual (SCOTT, 2000).

Podem ser descritos dois mecanismos distintos de angiogênese: a angiogênese por brotamento (RISAU, 1997) e a angiogênese por intussuscepção (CADUFF et al., 1986).

A angiogênese por brotamento consiste na proliferação das células endoteliais e o subsequente aumento do calibre do vaso, a que se segue a migração de células para o lúmen, subdividindo-se o vaso inicial em vários vasos de menor calibre (RISAU, 1997).

Outro mecanismo de angiogênese é a intussuscepção, e refere-se ao processo pelo qual um único capilar se divide longitudinalmente em dois pela formação de um septo. Neste caso, as células endoteliais de lados opostos do vaso se estendem intraluminalmente até entrarem em contato formando um septo, levando ao surgimento de dois vasos (CADUFF et al., 1986). Ela ocorre quando o sistema capilar se expande “dentro dele mesmo” como, por exemplo, no crescimento do tipo intersticial no tecido cartilaginoso (CADUFF et. al., 1986).

1.2 REGULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE

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

Nesse contexto inconstante, o mecanismo angiogênico parece atuar como uma balança, em que, de um lado estão os ativadores, e do outro, os inibidores. É do resultado deste balanço que sobrevém um maior ou menor estímulo para a proliferação vascular. Em muitas patologias há desregulação desse balanço, o que justifica a identificação de uma resposta em cascata visando ao restabelecimento da homeostasia (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

1.3 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 da célula endotelial derivado de plaqueta (*Platelet-derived endothelial cell growth factor- PD-ECGF*), os fatores de crescimento derivados de plaquetas, como as prostaglandinas, angiotensina e a heparina, e o fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor α - TNF α*) (BRAT; VAN MEIR, 2001).

Devido à ação harmoniosa, complementar e coordenada destas moléculas é que se formam vasos funcionais (DANIEL; ABRAHAMON, 2000).

Dentre as inúmeras moléculas indutoras da angiogênese, se destaca o VEGF (CARMELIET, 2003). Embora tendo ação predominante na estimulação da angiogênese, o VEGF forma apenas vasos imaturos, não funcionais e instáveis (McMAHON, 2000).

O VEGF foi primeiramente descrito como fator de permeabilidade vascular e se constitui em uma família de moléculas mitogênicas endoteliais, indutoras da angiogênese *in vivo* (FRELIN et.al., 2000).

O VEGF tem participação central na regulação da proliferação vascular, podendo ter sua expressão induzida ou reprimida conforme a oxigenação tecidual. Por exemplo, caso exista uma lesão na pele, o organismo promove uma resposta imunitária local e inicia o processo de cicatrização. Esses fenômenos aumentam as necessidades de oxigênio e induzem a síntese do fator indutor de hipóxia (*Hypoxia Inducible Factor*) em resposta à hipóxia, que aumenta a expressão do VEGF e estabiliza o seu RNA mensageiro (RNAm). Quando a ferida é cicatrizada e existe um excesso de aporte de oxigênio, estimula a síntese do fator indutor de hiperóxia (*Hyperoxia Inducible Factor*), que inibe a expressão do VEGF e instabiliza seu respectivo RNAm (SEMENZA, 2002).

Existem quatro isoformas principais do VEGF (VEGF-A), cada uma codificada por uma porção diferente do gene VEGF. São estas suas isoformas: VEGF121, VEGF165, VEGF189, e VEGF206. Embora estas isoformas se comportem identicamente em solução, elas diferem na sua capacidade de ligação à heparina e à matriz extracelular (RINI; SMALL, 2005).

As Angiopietinas (Ang) são uma família de duas moléculas (Ang1, Ang2) que se ligam ao mesmo receptor, o TK. A Ang1 induz as células endoteliais a liberarem fatores de crescimento que promovem a associação aos pericitos e às células musculares lisas, incorporando-se aos vasos (JONES et al., 2001).

A Ang2, ao ligar-se ao TK, inibe a ação da Ang1, resultando uma instabilização vascular que leva ao afastamento dos pericitos e células musculares

lisas. Por ação da Ang2, é obtido um “tubo endotelial” (estrutura tubular revestida por células endoteliais que ainda não formam um vaso maduro) que, na presença de VEGF, aumenta a angiogênese e, na sua ausência, conduz à apoptose das células endoteliais e à regressão vascular (JONES et al., 2001).

A Efirina-B2 e a Ang1 são essenciais na maturação vascular, sabendo-se hoje que a Efirina- B2 é particularmente importante na diferenciação arterial ou venosa dos vasos imaturos (YANCOPOULOS; KLAGSBRUN; FOLKMAN, 1998). A Ang1 é essencial para a estabilidade vascular. A interrupção desse sinal estabilizador coincide com o reinício da angiogênese, mediada por um antagonista da Ang1, a Ang2, que é uma secreção autócrina do endotélio. Esse processo ocorre primariamente no desenvolvimento estrutural, sendo reativado na angiogênese do adulto (aparelho reprodutor feminino, na cicatrização de feridas, em tumores, entre outros) (ELLIS et.al., 2002).

Já os fatores de crescimento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factors* - aFGF e bFGF), potentes moduladores da proliferação celular, motilidade e diferenciação não são específicos quanto a sua atuação sobre as células endoteliais pois atuam também em fibroblastos, células musculares lisas e neurônios (GERWINS; SKOLDENBERG; CLAESSION-WELSH, 2000). Desempenham um papel central na iniciação do processo angiogênico (CHEN, J.; FOROUGH, R., 2006).

Os fatores aFGF1 e bFGF2, devido à sua potente ação mitogênica e atividade pró-migratória, têm a capacidade de induzir alterações metabólicas e fenotípicas na célula endotelial que são necessárias para estimular a angiogênese (CHEN, J.; FOROUGH, R., 2006).

São fatores que merecem destaque, já que são proteínas angiogênicas mais potentes *in vivo*. Em conjunto com a Ang2, tornam-se mais específicos: a Ang2, ao repelir as células musculares, potencializa a sua ação nas células endoteliais. Estes fatores tem duas origens principais: a matriz extracelular, onde está armazenado, sendo mobilizado por proteinases e heparinases e os macrófagos ativados (GERWINS; SKOLDENBERG; CLAESSION-WELSH, 2000).

Existem níveis anormalmente elevados de bFGF no soro e urina de indivíduos com diversos tipos de tumor, e no líquido céfalo-raquidiano de doentes com vários tipos de tumores cerebrais (REYNOLDS; REDMER, 1998).

Há ainda um fator que pela sua síntese muito específica por parte da placenta ao longo da gravidez, adquiriu o nome de fator de crescimento da placenta (*placental inducible growth factor*- PIGF). Suas ações são semelhantes às do VEGF, porém mais potentes, sendo importante na gravidez (SMITH et al., 2000).

Os principais receptores que parecem envolvidos nas cascatas de transdução de sinal em resposta ao VEGF são uma família de receptores tirosina-quinase com três membros: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Paralelamente, estão identificados alguns receptores acessórios, as neurofilinas, que modulam a ligação aos receptores principais. O VEGFR-2 é o principal mediador nos efeitos do VEGF no crescimento e permeabilidade dos vasos. Já o VEGFR-1 pode ter um papel negativo, suprimindo a sinalização pelo VEGFR-2 (BERNATCHEZ et al, 1999).

O VEGFR-3, que está presente essencialmente nos vasos linfáticos e parece levar à proliferação destes, tem grande afinidade pelo VEGF-C (SHIBUYA et. al., 2001).

Membros da família do VEGF	Receptores	Função
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1.	Angiogênese, manutenção vascular
VEGF-B	VEGFR-1	A estabelecer
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	Linfangiogênese
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	Linfangiogênese
VEGF-E (fator viral)	VEGFR-2	Angiogênese
*PIGF	VEGFR-1, neuropilina-1	Angiogênese e inflamação

Quadro 1 - Promotores angiogênicos VEGF e seus receptores

*PIGF: fator de crescimento da placenta

Fonte: GENENTECH, BIONCOLOGY – Disponível em:

<<http://www.researchvegf.com/researchvegf/ligand/vegf/index.m>>

1.4 INIBIDORES ENDÓGENOS DA ANGIOGÊNESE

Inibidores endógenos da angiogênese são moléculas cuja síntese laboratorial está em franca expansão, estando identificadas inúmeras aplicações terapêuticas (FERRARA; KERBEL, 2005).

A angiostatina, endostatina, fator plaquetário 4, prolactina, trombospondina, os inibidores teciduais de metaloproteinase 1, 2, 3 (*tissue inhibitor of metalloprotenase 1-TIMP-1*, *tissue inhibitor of metalloprotenase 2-TIMP-2*, *tissue*

inhibitor of metalloprotenase 3-TIMP-3) são proteínas inibidoras da angiogênese (BRAT; VAN MEIR, 2001).

Entre as moléculas mais importantes salientam-se a angiostatina, a endostatina e a antitrombina III (REYNOLDS; REDMER, 1998).

Vários ensaios clínicos demonstraram que certos tumores poderiam produzir inibidores angiogênicos (CARMELIET, 2003). 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).

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

1.5 ANGIOGÊNESE NO TUMOR

Para se analisar o crescimento tumoral deve-se supor que no tumor coexistam dois compartimentos celulares que se estimulam mutuamente: o compartimento das células endoteliais e o compartimento das células tumorais (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

A existência de hiperemia tumoral tornou-se conhecida há cerca de dois séculos, durante as intervenções cirúrgicas (FOLKMAN, 2006). Contudo, até 1970 o fato era explicado pela dilatação dos vasos sanguíneos preexistentes, como resultado do processo inflamatório que acompanhava o tumor. No início da década de 70, surgiu a hipótese de que os tumores poderiam recrutar o seu próprio aporte sanguíneo através da produção e liberação de moléculas estimuladoras da formação de novos vasos sanguíneos. Essa hipótese foi aceita com ressalvas. Somente após a introdução da cultura de células endoteliais, da purificação de proteínas angiogênicas, e do advento da biologia molecular, foi possível a sua confirmação (McDONNELL et al., 2000).

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

Na maioria dos tumores humanos, o fenótipo maligno histologicamente reconhecível precede o fenótipo angiogênico (BERTRAM, 2001). Clinicamente, a migração para a condição angiogênica é reconhecida pela rápida expansão da massa tumoral para dimensões detectáveis, hemorragias locais e metastização. No caso da metastização, a angiogênese é necessária no início e ao final (KIRSCH et al., 2000; ZETTER, 1998).

Em animais experimentais, foi observado que antes da neovascularização raramente eram encontradas células tumorais em circulação, sendo as metástases virtualmente inexistentes (ZETTER, 1998). Quando ocorre a neovascularização, a metastização surge de imediato e de maneira proporcional à vascularização (KIRSCH et al., 2000; ZETTER, 1998). Por outro lado, as metástases que subsistem à distância, tornam-se detectáveis após desenvolverem vascularização própria, pois de outra forma, mantêm-se indefinidamente quiescentes (KIRSCH et al., 2000; ZETTER, 1998).

Comprovada a importância da angiogênese no desenvolvimento tumoral, particularmente no processo de metastização, os fármacos inibidores da angiogênese apresentam-se como uma arma terapêutica no tratamento de várias neoplasias, quando combinados com a quimioterapia, resultando em um aumento de sobrevida nos pacientes com tumores malignos avançados (CARMELIET, 2003). Mesmo que não seja obtida a cura, estes fármacos podem viabilizar o controle da doença (ZETTER, 1998; FERRARA; KERBEL, 2005; BALUK et al., 2005).

O uso de fármacos inibidores da angiogênese tem inúmeras vantagens em comparação à quimioterapia convencional. Os agentes citostáticos, substâncias citotóxicas utilizadas especificamente para causar um dano celular, não são seletivos para as células tumorais, sendo inespecíficos, acabam por destruir também células não neoplásicas, constituindo um entrave ao aumento das doses e são responsáveis pelos seus inúmeros efeitos adversos (GOODMAN; GILMAN, 2006). Acrescenta-se ainda, que as células tumorais são geneticamente instáveis, com elevado índice de mutações, o que conduz muitas vezes à resistência a drogas

inicialmente eficazes (CARMELIET, 2005). É provável que mantenham sensibilidade à terapia antiangiogênica, sendo as células endoteliais geneticamente estáveis e com baixo índice de mutação, comparadas às células tumorais e outras células somáticas (FERRARA; KERBEL, 2005).

Os citostáticos clássicos podem começar a ser usados de maneira diferente como na aplicação de doses menores, ao longo de um tempo maior, embora exerça menos efeito no tecido tumoral, consegue inibir a divisão das células endoteliais, reprimindo a angiogênese (KERBEL; KAMEN, 2004). Dessa forma, evita-se o crescimento e a metastização do tumor. Esse é também o princípio da radioterapia fracionada, que utiliza o aumento da frequência das exposições com doses menores (PUDUVALLI; SAWAYA, 2000). Tem-se estudado esquemas combinados dos vários fármacos disponíveis, com o objetivo de inibir as várias etapas do desenvolvimento tumoral e aproveitar o efeito sinérgico das drogas (PUDUVALLI; SAWAYA, 2000).

A utilização da densidade microvascular como indicador prognóstico tem sido alvo de inúmeros estudos (BERGERS; BENJAMIN, 2003). Porém, há ainda relativo desconhecimento quanto à integração das múltiplas “cascatas angiogênicas e anti-angiogênicas”, sendo difícil especular sobre o prognóstico da evolução tumoral em função da maior ou menor vascularização (MACDONALD et al., 2002).

1.6 MODELO ANIMAL

O hamster dourado ou sírio *Mesocricetus auratus*, é um roedor da família Cricetidae. Os hamsters dourados silvestres ocorrem em uma faixa de área limitada do Oriente Médio, na Síria, onde são chamados pelo equivalente arábico de “possuidores de bolsas para carregar”, em virtude de suas bolsas faciais (HARKNESS; WAGNER, 1993).

Estes animais vivem em profundas galerias, onde estocam grandes quantidades de grãos, apresentam cauda curta quando comparada com a de ratos Wistar e são pequenos (cerca de 100g de peso). São conhecidos pelo curto período de gestação, fácil domesticação, presença de bolsas faciais, tolerância imunológica e pela grande habilidade em escapar do confinamento (HARKNESS; WAGNER, 1993). Em laboratório alimentam-se com ração peletizada ou dieta para roedores

com alto teor de proteínas e geralmente permanecem saudáveis e ativos durante sua vida. Os hamsters possuem tempo de vida que varia entre 18 e 24 meses, entretanto, animais mais idosos também podem ser observados (HARKNESS; WAGNER, 1993).

Os hamsters apresentam alto grau de tolerância imunológica a transplantes homólogos e heterólogos de tecidos normais ou neoplásicos (BILLINGHAM, et al., 1960). São animais com sistema imune íntegro, possuindo um “local de privilégio imunológico” natural nas suas bolsas jugais (LEMON et.al., 1952). As bolsas servem ao hamster como meio de estocagem de alimentos e ao homem como um sítio de privilégio imunológico para uso em pesquisa, já que são facilmente acessíveis para indução de tumor.

As bolsas jugais ou faciais são divertículos bilaterais das mucosas jugais, altamente distensíveis que se estendem, sob a pele, da extremidade posterior da comissura labial até aproximadamente ao 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, ao ser evertida, assume um aspecto sacular. Apresenta camadas basal, espinhosa, granular e córnea com queratinócitos, similar à epiderme e epitélio da gengiva ou palato duro humano (WHITE et. al., 1982).

As camadas de células epiteliais apóiam-se em tecido conjuntivo frouxo, naturalmente imunodeficiente e aparentemente com ausência de vasos linfáticos, exceto na região proximal, onde se inserem as fibras do músculo retrator da bolsa (GOLDENBERG; STEINBORN, 1970).

A bolsa jugal do hamster é um excelente sítio para o estudo de carcinoma da mucosa oral porque é susceptível a modificações por uma variedade de influências locais e sistêmicas (GIJARE et al., 1990), sendo um dos modelos usados nas pesquisas de câncer oral (SALLEY, 1954; EVESON, 1980; MOGNETTI et al., 2005).

1.7 AGENTES CARCINOGENICOS

1.7.1 9,10 dimetil benzatraceno (DMBA)

O composto 9,10 dimetil benzatraceno (DMBA), agente carcinogênico iniciador, induz uma transversão no par de bases adenina-timina (A-T) na segunda posição do códon 61 do gen *ras*, sendo esta mutação freqüentemente identificada em carcinomas de células escamosas (SAM; WATT, 2006).

Em 1954, Salley relatou que aplicações de um ou vários hidrocarbonetos policíclicos podem induzir a carcinoma de células escamosas na mucosa de hamster. O autor aplicou DMBA dissolvido em éter e este se apresentou como um carcinogênico efetivo na indução de tumores após 16 semanas. O autor descreveu 4 estágios histologicamente reconhecíveis na mucosa, que vão desde hiperplasia, papiloma, carcinoma *in situ*, até carcinoma de células escamosas.

Morris (1961) relatou que o epitélio da bolsa jugal de hamsters idosos apresentaram maior resistência à ação do DMBA do que animais jovens. O autor relatou que: cinco semanas, é o tempo necessário para iniciar as análises de carcinogênese experimental. A carcinogênese na bolsa jugal de hamster é provavelmente o sistema animal mais comparável com o desenvolvimento de pré-malignidade e malignidade do câncer bucal humano. Além disso, o autor definiu que 0,5% de DMBA em solução de acetona, produz o efeito máximo de neoplasia, com o mínimo de período de latência e sem morbidade. Morris (1961) padronizou o procedimento, de tal modo que a lesão experimental pôde ser reproduzida posteriormente.

O DMBA 0,5% induz uma resposta hiperplásica no epitélio da bolsa após poucas aplicações, constatando-se pela aparência de variedades de lesões displásicas parecidas com lesões pré-malignas humanas, após seis a oito semanas de tratamento (SANTIS et al., 1964). Tumores benignos e malignos, lesões papilomatosas e carcinomas, especificamente de células escamosas começam a ser evidenciados após algumas semanas de tratamento (SANTIS et al., 1964). Contudo, estágios de carcinogênese (iniciação, promoção, progressão) não têm sido bem definidos (GIMENEZ-CONTI; SLAGA, 1993).

Lin et al. (1996) obtiveram 100% de incidência de tumor na bolsa jugal de hamster após aplicação de DMBA três vezes por semana por oito semanas consecutivas.

A maior vantagem da aplicação do DMBA neste modelo animal é a similaridade entre a mucosa da bolsa jugal do hamster e a mucosa oral mastigatória humana. Além disso a ausência de indução de carcinomas espontâneos, desenvolvimento de lesão displásica comparável com a leucoplasia humana oral e a susceptibilidade do sistema de tumor a influências sistêmicas como vitaminas, hormônios e várias drogas (SHKLAR et al., 1979).

Outra característica desse modelo está na possibilidade de acompanhamento macroscópico da evolução do tumor, em tempos diferentes após o tratamento, pela simples eversão da bolsa, e o mesmo também permite delimitação dos sítios onde está sendo induzida a lesão (KREIMANN et al., 2001).

A maior desvantagem do modelo experimental em bolsa jugal de hamster é o procedimento intensivo laboratorial, em adição ao extensivo manuseio do animal com o carcinógeno. No modelo clássico de Salley (1954) e no modelo modificado de Lin et al. (1996), o animal é manuseado, no mínimo, 48 vezes durante a indução do tumor.

1.7.2 Peróxido de Carbamida

O peróxido de carbamida, um agente promotor da carcinogênese, pode ser encontrado comercialmente nas concentrações de 10%, 11%, 15%, 16% e 35% em anidro glicerol ou glicerina ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}_2$) (DISHMAN; BAUGHAN, 1992; FASANARO, 1992; KWONG et al., 1993; McGUCKIN; MEYER, 1992). É também conhecido como peróxido de uréia, peróxido de hidrogênio-uréia, peróxido de hidrogênio-carbamida ou peridrol-uréia; sendo muito utilizado na técnica caseira de clareamento de dentes vitais (DARNELLA; MOORE, 1990; FASANARO, 1992; HAYWOOD; HEYMANN, 1989). O peróxido de carbamida nas concentrações mais usadas é uma substância instável e quando em contato com a saliva se dissocia em 3,6% a 5% de peróxido de hidrogênio e 6,4% a 7% de uréia (FASANARO, 1992; HAYWOOD, 1992; HUMMERT et al., 1993). O peróxido de hidrogênio presente no peróxido de carbamida, por sua vez, se dissocia em oxigênio e água, quebrando-se

posteriormente e liberando radicais livres; a uréia dissocia-se em amônia e dióxido de carbono (HAYWOOD; HEYMANN, 1989; HAYWOOD et al., 1990; FASANARO, 1992; HAYS et al., 1995).

O peróxido de hidrogênio é o princípio ativo do peróxido de carbamida (NAIK, et al., 2006). A presença de radicais livres originários da quebra do peróxido de hidrogênio pode ser nociva pelo fato de que, os ânions superóxidos e os íons hidroxila liberados são radicais oxidantes altamente reativos e tóxicos, um vez que agem diretamente nos componentes vitais das células, onde podem danificar membranas celulares, alterar o DNA e as proteínas, podendo causar mutações (CHERRY et al., 1993; IMLAY; LINN, 1988; POWELL; BALES, 1991). Sabe-se, porém, que o organismo possui mecanismos de defesa bioquímicos e mecanismos de reparo intracelulares que reagem com os radicais livres inativando-os, como é o caso de sistemas enzimáticos que controlam o ciclo celular (FRIDOVICH, 1978).

Ito et al. (1981) avaliaram a indução de tumores duodenais em ratos pela administração de peróxido de hidrogênio. A solução de peróxido de hidrogênio foi adicionada na água destilada para beber, nas concentrações de 0,1% e 0,4%. Os autores verificaram que os grupos de 0,1% e 0,4% de diluição apresentaram alta incidência de hiperplasia duodenal com índices de 40% e 62% respectivamente. Adenoma duodenal foi encontrado em 5% dos ratos, no grupo em que foi administrada a concentração de 0,4%, e em 1% dos animais, no grupo em que foi administrada a concentração de 0,1%. Erosões gástricas surgiram após 40 semanas; hiperplasia duodenal, após 10 semanas e carcinomas duodenais em 65 semanas. Os autores concluíram que o peróxido de hidrogênio pode ter dupla função na formação de nódulos duodenais, ampliando a ocorrência espontânea de hiperplasia duodenal e transformando nódulos hiperplásicos em neoplásicos.

Weitzman et al. (1984), discutiram a possibilidade dos metabólitos do peróxido de hidrogênio danificarem o DNA das células e causarem mutações. Os autores alertaram para os perigos da administração crônica do peróxido de hidrogênio no tratamento de doenças gengivais, pois a exposição constante pode levar a alterações indesejáveis nos tecidos. As células são danificadas quando expostas a altas concentrações de oxidantes. A

preocupação é que os peróxidos possam aumentar a expressão de tumores por outros carcinógenos do meio ambiente (WEITZMAN et al.,1984). O tumor, para se manifestar, pode demorar anos ou décadas em humanos (WEITZMAN et al.,1984).

Weitzman et al. (1986), avaliaram o efeito carcinogênico do peróxido de hidrogênio no modelo de carcinogênese química bucal induzida em hamster. Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo que o grupo I recebeu DMBA; o grupo II recebeu DMBA e peróxido de hidrogênio 3%; o grupo III recebeu DMBA e peróxido de hidrogênio 30%; e o grupo IV recebeu peróxido de hidrogênio 30%. A concentração de DMBA foi de 0,25% em óleo mineral. As bolsas jugais do hamster foram pinceladas duas vezes por semana com os carcinógenos, e o sacrifício foi realizado após 19 e após 22 semanas. Foi observada a presença de queratose e hiperplasia em mais de 85% dos animais em todos os grupos após 19 semanas. Após 22 semanas, os animais do grupo I apresentaram carcinomas epidermóides em três de sete animais; no grupo II, seis de 11 animais desenvolveram carcinomas em 22 semanas e todos os animais do grupo III desenvolveram carcinomas invasivos. No grupo IV, os animais não desenvolveram carcinomas, porém, apresentaram mudanças associadas a lesões pré-neoplásicas, incluindo hiperchromatismo de células e displasia média. Os resultados sugeriram uma ação co-carcinogênica do peróxido de hidrogênio no modelo analisado e este, isolado ou associado, provocou mudanças pré-neoplásicas e aumentou a atividade mitótica e hiperplásica.

1.8 TÉCNICA DE MODELO DE CORROSÃO VASCULAR

A técnica de modelo de corrosão vascular associada à MEV tem sido aplicada no estudo do padrão vascular de órgãos e tecidos normais, de processos patológicos e de estruturas em desenvolvimento (LAMETSCHWANDTNER; LAMETSCHWANDTNER; WEIGER, 1990; DERUITER et al., 1991). Os modelos vasculares desses órgãos e tecidos são obtidos pela modelagem do lúmen dos vasos com resina de baixa viscosidade, seguida pela corrosão com solução alcalina, do tecido circunjacente à resina

polimerizada (WEEKES; SIMS, 1986; HODDE; STEEBER; ALBRECHT, 1990; OHTA et al., 1992; SUGIOKA; IKE, 1993; PIETTE; LAMETSCHWANDTNER, 1994; SELLISETH; SELVIG, 1995b; KRONKA; WATANABE; SILVA, 2001; VERLI, F.D. et al, 2007).

O modelo de corrosão vascular fornece a angioarquitetura da estrutura anatômica (AHARINEJAD; BÖCK, 1994), sendo que alguns dos aspectos morfológicos observados são: o arranjo tridimensional da vascularização, o diâmetro vascular, a impressão dos núcleos das células endoteliais na superfície do modelo vascular, bem como o trajeto das arteríolas e vênulas que compõem a estrutura avaliada (HOSSLER; DOUGLAS, 2001).

A moldagem é realizada com resina Mercocox® (Mercocox® CL – 2RB, Ladd Research Industries, Burlington, VT), material de moldagem vascular à base de metilmetacrilato, bastante utilizado nas pesquisas de modelo de corrosão vascular (KOGUSHI et al., 1988; OHSHIMA; YOSHIMA; KOBAYASHI, 1990; AHARINEJAD; BÖCK, 1994; NINOMIYA, 2000; VERLI, F.D. et al, 2007) .

Após a moldagem, é realizada a corrosão, que é a dissolução dos tecidos circunjacentes à moldagem, utilizando soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH), associadas ou não a detergentes em diferentes concentrações (HODDE; STEEBER; ALBRECHT, 1990; LAMETSCHWANDTNER; LAMETSCHWANDTNER ; WEIGER, 1990).

Após corrosão dos espécimes, estes sofrem tratamento condutivo, que consiste no revestimento dos espécimes com uma camada metálica (metalização). Com a adição desta camada, há condução de elétrons sobre as superfícies dos espécimes e a produção de elétrons capazes de gerar sinal suficiente para a formação da imagem em MEV (LAMETSCHWANDTNER; LAMETSCHWANDTNER; WEIGER, 1990; BELZ; AUCHTERLONIE, 1995).

As eletromicrografias de varredura de arteríolas, vênulas, artérias, veias e alças capilares obtidas pela técnica de corrosão vascular fornecem imagens tridimensionais individualizadas dessas estruturas. Essas imagens proporcionam informações específicas dos modelos vasculares como diâmetro vascular e a impressão das células na superfície dos modelos (HODDE; STEEBER; ALBRECHT, 1990; KONERDING, 1991). A análise dos modelos de corrosão vascular é principalmente descritiva (KONERDING, 1991).

5.6 CONCLUSÃO

O entendimento da morfologia da microcirculação tem um papel importante na compreensão dos fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos de todos os sistemas orgânicos.

