

Karina Morais Faria

**Carcinogênese Bucal DMBA Induzida com Aplicação de Imunomodulador
P-MAPA**

Araçatuba, SP-2010

**Carcinogênese Bucal DMBA Induzida com Aplicação de Imunomodulador
P-MAPA**

**Trabalho de Conclusão de Curso,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

Orientadora: Prof. Ass. Dra. Renata Callestini Felipini

Araçatuba, SP-2010

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, aos meus pais **Adonizete e Marlene** por me proporcionarem a oportunidade de concluir o curso de Odontologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP-Campus de Araçatuba.

A minha orientadora **Profa. Dra. Renata Callestini Felipini**, pela confiança na realização deste projeto.

Ao meu companheiro **Gustavo Morelli**, pela paciência e sabedoria sem a qual a dedicação, amor e prestreza jamais seria possível ter realizado este trabalho.

Ao amigo **Gustavo Silles**, pela amizade e os momentos de descontração, e qual foi fundamental a participação.

Em especial ao **Marcelinho** pelo auxílio quando precisamos e todos os funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica.

A **Farmabrasilis** por nos ter fornecido o Imunomodulador P-MAPA e nos permitiu fazer parte da sua equipe científica.

Aos **amigos** que torceram pela chegada deste momento e sempre me apoiaram.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Corafina

Epígrafe

“Pouco importa o julgamento dos outros. Os seres são tão contraditórios que é impossível atender às suas demandas, satisfazê-los. Tenha em mente simplesmente ser autêntico e verdadeiro...”

Dasai Lama

Resumo

Atualmente ocorrem cerca de 262.000 óbitos por cânceres da cavidade oral e da faringe em todo mundo, dos quais 83% são em países em desenvolvimento. Os carcinomas espinocelulares são as neoplasias orais mais freqüentes, constituindo cerca de 90% dos casos. As principais causas das neoplasias são atribuíveis a influências ambientais, a agentes biológicos irritações mecânicas crônicas e hábitos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação imunomoduladora do medicamento P-MAPA em modelo experimental de carcinogênese induzida em hamster sírius dourados com hidrocarboneto 7-12-Dimetil Benzatraceno (DMBA) e análise histopatológica tumoral. Foram utilizados 48 hamsters sírius dourados (*Mesocriatus auratus*) sendo 24 machos e 24 fêmeas com 60 dias e um peso corporal médio entre 90 e 100 gramas. Os animais foram distribuídos em seis grupos, sendo três grupos tratados e três grupos controles, apresentando 8 animais em cada grupo, correspondendo a três períodos experimentais no intervalo de 7, 16 e 22 semanas. No final de cada tempo estabelecido por grupo, os animais foram eutanasiados empregando-se overdose de anestésico associado a relaxante muscular cloridrato de quetamina a 10% e cloridrato de xilazina 0,01 mL/100 g de peso corporal, via intraperitoneal. As bolsas intrabuciais e órgãos alvo, fígado, timo, baço, rim, pulmão, fêmur e placa de payer foram retirados para avaliação macroscópica e confecção de lâminas utilizando-se a coloração de rotina pela hematoxilina-eosina para verificação de alterações e comparação entre os grupos controles e tratados em seus diferentes tempos. Morfologicamente notou-se alterações nos grupos controles entre após o período de 16 semanas. O imunomodulador P-MAPA desempenha efeito protetor no desenvolvimento dos tumores bucais DMBA induzidos, pois os grupos tratados demonstraram frente ao processo de carcinogênese.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular, hamster sírius dourados, DMBA, P-MAPA, imunoterapia.

Abstract

Currently there are approximately 262,000 deaths from cancers of the oral cavity and pharynx worldwide, of which 83% are in developing countries. The Squamous cell carcinomas are the most frequent oral cancer, constituting about 90% of cases. The leading causes of cancer are attributable to environmental influences, biological agents and chronic mechanical irritation habits. The aim of this study will evaluate the immunomodulating effects of the drug P-MAP in experimental carcinogenesis induced in golden hamster sirius 7-12 hydrocarbon-Dimethyl Benzatraceno (DMBA) through routine staining with hematoxylin-eosin and tumor histopathology. A total of 48 golden hamsters sirius (*Mesocriatus auratus*) were used 24 males and 24 females with 60 days and an average body weight between 90 and 100 grams. The animals were divided into six groups: three treated groups and three control groups, with eight animals in each group, corresponding to three experimental periods in the range of 7, 16 and 22 weeks. After each time set by group, animals were euthanized using overdose of anesthetic is associated with muscle relaxant ketamine 10% and xylazine 0.01 mL/100 g body weight intraperitoneally. Grants intraoral and target organs were removed for macroscopic evaluation and later preparation of slides using routine staining with hematoxylin-eosin for examination and comparison of changes between the control and treated at different times. Morphological change was noted between the control groups after 16 weeks. The P-MAP performs immunomodulatory protective effect on the development of DMBA-induced oral tumors, because the treatment groups demonstrated against the carcinogenesis process.

Keywords: squamous cell carcinoma, sirius golden hamster, DMBA, P-MAP and immunotherapy

SUMÁRIO

1. Introdução.....	página 09
2. Revisão de Literatura.....	página 11
3. Proposição.....	página 14
4. Materiais e Métodos.....	página 15
5. Resultados.....	página 22
6. Discussão.....	página 41
7. Conclusão.....	página 42
8. Referências.....	página 34

Lista de Figuras

	Página
Figura-01 _____	06
Figura-02 _____	07
Figura-03 _____	08
Figura-04 _____	09
Figura-05 _____	10
Figura-06 e 07 _____	11
Figura-08 _____	12
Figura-09 _____	13
Figura-10 _____	19
Figura-11 _____	20
Figura-12 e 13 _____	21
Figura-14 e 15 _____	22
Figura-16 _____	23
Figura-17 e 18 _____	24
Figura-19 e 20 _____	25
Figura-21 _____	26
Figura-22 e 23 _____	27
Figura-24 _____	28
Figura-25 _____	29
Figura-26 e 27 _____	30
Figura-28 e 29 _____	31

1. Introdução

O câncer é caracterizado pela formação de uma massa de tecido anormal, cujo crescimento excede e é desorganizado em relação ao tecido normal. Este crescimento persiste mesmo após a interrupção do estímulo que o evocou (ROBBINS et al., 2000). O câncer tem causas variadas, externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente cultural e social. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2007).

A incidência e as altas taxas de mortalidade fazem do câncer um importante problema de saúde pública e esforços devem ser mobilizados para sua prevenção e cura. A prevenção primária do câncer, com ênfase nos fatores associados ao estilo de vida e no combate a agentes ambientais e ocupacionais cancerígenos, pode trazer bons resultados na redução da incidência desta doença (BRASIL, 2006).

A quimioproteção contra o câncer pode resultar da ação de uma substância que pode bloquear o início do processo neoplásico, deter ou reverter a progressão das células iniciadas para fenótipos malignos. Logo pode ocorrer por diferentes mecanismos que incluem redução da intoxicação por metabólitos carcinogênicos e/ou aumento da desintoxicação (CHEN & KONG, 2004).

A forma pela qual o homem tem interpretado os fenômenos da natureza, dentre estes os biológicos, vem mudando continuamente. Os conceitos sobre saúde e doença diretamente influenciados pelos conhecimentos científicos, contribuem significativamente para a compreensão do organismo humano e conseqüente evolução da espécie.

Baseado nisto a procura por modalidades terapêuticas que tenham como objetivo a prevenção, representam o principal alvo de investigação da carcinogênese estando diretamente relacionada ao acúmulo de alterações genéticas, particularmente os genes que regulam o crescimento, diferenciação, morte celular e reparo do DNA.

Dentre as neoplasias que afetam o corpo humano, as relacionadas à cavidade bucal compreendem significativa incidência, acometendo principalmente homens a partir da quinta década de vida (PARISE JR., 2000).

A indução de tumor em cavidade bucal de roedores por substâncias carcinogênicas tem sido frequentemente relatada na literatura (AL-Damouk, 1997; Mesquita ET AL 2003). Descrito pela primeira vez na literatura por Salley 1954, a aplicabilidade desses modelos tem contribuído para o conhecimento das bases moleculares e bioquímicas do desenvolvimento tumoral, pois produzem um espectro de alterações gênicas e fenotípicas similares aos dos seres humanos. Entre estes incluem o padrão de alteração metastática, alterações mutagênicas, mudança no padrão de maturação epitelial, desregulação da proliferação epitelial. (SALLEY, 1954; CASTRO e SILVA Jr . ET AL 2004) Nos últimos anos as pesquisas se direcionam para terapias que atuem na inibição do desenvolvimento tumoral atuando como alternativas para o aumento da sobrevida de pacientes portadores de neoplasias malignas e atuar no combate imunológico.

A imunoterapia vem se consolidando como forma de tratamento e há muito tempo se reconhece a relação entre competência imunológica e evolução favorável da doença maligna. Especificamente, a redução da atividade das células supressoras, que tem sido demonstrada em pacientes com câncer de ovário, neuroblastoma, carcinoma hepatocelular e outras neoplasias.

Essa observação está mais relacionada à presença de doença avançada do que ao tipo histológico do tumor e também oferece as bases para a imunoterapia de pacientes com câncer, sob a hipótese de que a restauração da função imunológica pode levar a um melhor prognóstico do caso. Logo com a crescente busca do meio científico por novos fármacos foi desenvolvido o imunomodulador P-MAPA, com propriedades biológicas no aumento da resistência do sistema imune frente as neoplasias (FARMABRASILIS 2006).

Partindo-se do princípio que o imunomodulador P-MAPA tem evidências de participação no controle do desenvolvimento tumoral e que não existem trabalhos na literatura avaliando seu papel na inibição tumoral em neoplasias malignas de cabeça e pescoço, julgou-se válido e importante avaliar a resposta macroscópica e microscópica tecidual frente a indução da carcinogênese e a aplicação do P-MAPA.

2.Revisão de Literatura

O câncer causa cerca de 13% de todas as mortes no mundo sendo a etiologia das neoplasias multifatoriais (INCA 2008). O entendimento dos mecanismos moleculares e imunológicos que ocorrem no organismo, em seu estado fisiológico e relacionados ao desenvolvimento tumoral, são de fundamental importância para instituição de medidas terapêuticas. (COTRAN, KUMAR E COLLINS, 2000; PARISE JR., 2000; ALBERT, 2002; DERKA et al. 2006).

Os fatores de risco reconhecidos em todo o mundo para o câncer oral são o fumo e álcool. (MARCHIONI, 2007, FISBERG, 2007, KOWALSKI, 2007). Além desses fatores, exposição a dietas pobres em frutas e vegetais, a agentes biológicos (vírus como o papilomavírus humano-HPV; fungos e bactérias), irritação mecânica crônica, exposição à radiação e má higiene oral podem ocasionar alterações epiteliais que tornam a mucosa oral mais vulnerável aos agentes carcinógenos. (KOWALSKI 1999, DIB 1999, IKEDA 1999, ADDE 1999, REGEZI 1999.)

O diagnóstico de tumores em fases avançadas coopera para o insucesso do tratamento e cura na maior parte dos casos. A procura por medicamentos que atuem de forma preventiva com menos efeitos colaterais e que possam prever com maior exatidão o comportamento de cada neoplasia em particular, representam o principal alvo de investigação da carcinogênese (SOUSA, 2004).A avaliação dos níveis de exposição e intensidade deve ser criteriosamente avaliada para designar o potencial carcinogênico e evolutivo dos tumores por meio de ensaios experimentais, bem como testes e questionamentos a serem esclarecidos sobre medicamentos com propriedades de combate ao câncer.

Na utilização de modelos experimentais para indução de carcinogênese química bucal destaca se o que se utiliza como 7-12-Dimetil Benzatraceno (DMBA); que comercialmente se apresenta sobre forma de pó de um hidrocarboneto aromático policíclico, que quando diluído a 0,5% em óleo mineral puro e aplicado sob forma tópica na mucosa bucal de modelo experimental hamster Sirius Dourados é capaz de produzir tumores malignos (BALASENTHIL 2000, FASSONI 1992 , LIMA 1997 ,MANJANATHA 2006, MANOHARAN 2006, MESQUITA 2003, MOHAN 2006, NAGINI 2000).

A utilização do hamster como animal de laboratório remonta a década de 1920; sendo os hamsters de origem chinesa os primeiros a serem utilizados em trabalhos experimentais. Devido ao pouco conhecimento sobre seus hábitos, mas facilidade no manejo e por ser um animal muito dócil a introdução desse roedor em pesquisas foi positiva. (LAKARS e HERRING, 1980; EVESON, 1981.

O modelo Hamster Sirius Dourados (*Mesocricetus auratus*) é utilizado em grupos experimentais de carcinogênese bucal, e deve-se ao fato destes animais possuírem bolsas laterais no interior da boca que servem de sítio para armazenamento de comida e filhotes quando estes se encontram ameaçados; sendo também um local oportuno para estudos, pois tratam-se de estruturas desprovidas de resposta imunológica propícias para o desenvolvimento de tumores induzidos, histologicamente semelhantes aos tumores humanos (AL-DAMOUC 1993, BALANSENTHIL 1999, HOSSIR 1987, MILLER 1989, NAGINI 2002, PIEROLI 2003, RAO 2002, SANTOS 2002, SLAGA 1992, THOMAS 2007).

A imunoterapia na atualidade possui papel estratégico no tratamento de tumores, apresentando-se como uma modalidade terapêutica que possui propriedades de auxiliar o controle da atividade do sistema imune, na regulação da intensidade de resposta aos antígenos vem se estabelecendo como uma forma segura de terapia para alguns tipos de câncer em virtude dos efeitos terapêuticos significativos e menor toxicidade e efeitos colaterais já que o tratamento do câncer de boca é particularmente mutilante, muitas vezes inabilitando o paciente para a reintegração familiar, social e profissional, temporária ou definitivamente. (BOONE 1997, KATIYAR 1997, MUKHTAR 1997, LORO 2003).

Nesta linha de pesquisas científicas e de necessidades de novos fármacos foi desenvolvido o imunomodulador P-MAPA, que demonstrou possuir valiosas propriedades biológicas quando utilizado em sistemas celulares, modelos animais e em estudos preliminares com seres humanos acometidos por neoplasias (FARMABRASILIS 2006).

Trata-se de um fármaco capaz de estimular a proliferação de linfócitos T, citocinas e restaura a atividade natural killer celular ampliando o complexo processo da resposta imunológica frente a desafios bacterianos, virais e processos neoplásicos. Também incrementa a mielopoese, e estimula a diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico.

Esta capacidade do produto para reverter ou minimizar *in vivo* o quadro de deficiência imunológica, associada à infecção mostrou-se capaz em experimentos controlados com proteção para os hospedeiros frente à inoculação experimental de doses letais de agentes infecciosos, resultando em altas taxas de sobrevivência e cura.

Em vista dessas propriedades citadas, o desenvolvimento do produto está também orientado para sua utilização como terapia em doenças infecciosas causadas por microorganismos de ciclo de vida intracelular estrita ou facultativa tais como vírus, protozoários e algumas espécies de bactérias. Os resultados obtidos com o uso do imunomodulador P-MAPA em experimentos realizados em modelos animais apropriados para o estudo destas infecções indicam sua grande potencialidade para utilização como terapia coadjuvante em doenças infecciosas causadas por microorganismos intracelulares tais como HIV, malária, leishmaniose, tuberculose e “punta toro vírus”. (FARMABRASILIS, 2006)

3. Proposição

Baseado em um modelo experimental para estudo da carcinogênese química bucal e sua semelhança com as neoplasias bucais humanas, e o número de trabalhos que associam substâncias exercendo um papel imunomodulador do câncer bucal é que foi desenvolvido este trabalho cujos princípios foram;

Avaliar macroscopicamente e microscopicamente as alterações decorrentes da aplicação tópica de DMBA, ratificando o seu potencial carcinogênico

Análise macroscópica do efeito antitumoral do Imunomodulador P-MAPA em hamsters DMBA induzidos.

Avaliação microscópica do efeito antitumoral do Imunomodulador P-MAPA em hamsters DMBA induzidos.

4. Materiais e métodos

Todos os procedimentos laboratoriais do presente estudo foram realizados nas dependências do biotério no laboratório de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

4.1 Amostra

A amostra foi composta por 48 *Mesocricetus auratus*, também denominados hamsters sírios dourados, divididos igualmente em machos e fêmeas, com peso corporal médio entre 100 gramas, separados em gaiolas pelo gênero, respeitando-se o limite de quatro animais por gaiola.



Figura 01. Animais dispostos em gaiola.

A alimentação foi ração apropriada (Ração Labina – Purina) e água *ad libitum*. A higienização das gaiolas foi realizada em dias alternados, com trocas dos papéis, lavagem e secagem.

As gaiolas foram dispostas uma ao lado da outra, apresentando identificação de cada animal com respectivo número e matriz geradora de tal grupo.

Com a finalidade de evitar possíveis trocas entre os grupos, no início do experimento foram realizadas marcações na orelha baseada no sistema australiano de marcação de suínos, utilizando para a confecção dos furos um alicate perfurador de lençol de borracha.

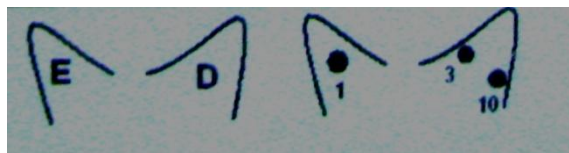


Figura 02. Sistema para marcação e identificação dos animais.

No biotério, o ambiente onde os animais permaneceram foi iluminado, obedecendo a um ciclo 12 horas de luz, 12 horas de escuro, apresentando uma temperatura ambiente entre 25° e 30°, sem exposição direta a radiação solar.

Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais de oito animais cada, três grupos tratados e três grupos controles com períodos experimentais de 7, 16 e 22 semanas. Os Grupos – I III e V controles receberam DMBA três vezes por semana sendo uma pincelada em cada bolsa e soro com aplicação subcutânea todos os dias com objetivo de submeter os animais ao mesmo nível de estresse.

Os grupos II, IV e VI tratados receberam DMBA três vezes por semana sendo uma pincelada em cada bolsa e aplicação subcutânea do imunomodulador P-MAPA todos os dias.



Figura 03. Hamster Sírius Dourados

4.2 Solução de 7-12-Dimetil Benzotraceno (DMBA)

O carcinógeno foi preparado com a finalidade de obtermos uma solução a concentração de 0,5% diluída em óleo mineral puro. O DMBA (Sigma, Chemical Company, St. Luis USA) na forma pó (100mg) foi diluído em 200 mL de óleo mineral. A solução obtida foi homogeneizada em um agitador para tubos de ensaio pelo período de 20 minutos, sendo posteriormente acondicionado em recipiente plástico âmbar, rotulada e conservada em temperatura ambiente e ao abrigo de luz no Laboratório do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia - UNESP- Araçatuba.

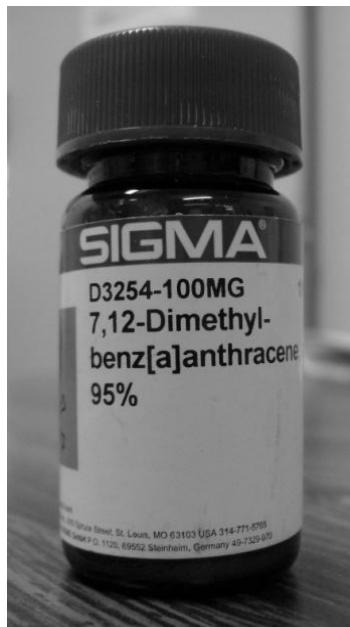


Figura 04. Carcinógeno DMBA

4.2.1 Aplicação do carcinógeno (DMBA)

Os animais eram contidos mecanicamente com um lençol de borracha, de modo que a cavidade bucal fosse aberta e as bolsas intrabucais visualizadas com auxílio de um afastador de tecidos, sempre tomando os devidos cuidados com a integridade do animal. A técnica de aplicação é baseada no modelo descrito pela primeira vez por SALLEY em 1954 e consiste em 1 pincelada em cada bolsa da solução de DMBA e óleo mineral com concentração a 0,5%, realizada com um pincel, pelo de camelo número quatro (04) da marca Tigre, nas duas bolsas realizando a aplicação três vezes por semana em todos os animais até o tempo de eutanásia de cada grupo, segundo a técnica empregada por Fassoni em 1992.



Figura 05. Aplicação do carcinógeno DMBA, através de pincelada na bolsa intrabucal.

4.3 Imunomodulador P-MAPA

O fármaco foi adquirido junto à organização não governamental Farmabrazilis. Ele vem sendo estudado intensamente desde anos 80 por cientistas brasileiros, chilenos e norte-americanos.

O P-MAPA é composto por agregados de polímeros, proteína, magnésio e amônio (phospholinoleate-palmitoleate anidrido), isolados de *Aspergillus oryzae*. Essa classe de substâncias está representada por moléculas e compostos que possuem a propriedade de auxiliar o controle da atividade imune, através da produção de citocinas. Essas atuam estimulando os linfócitos a proliferarem, iniciando e ampliando o processo da resposta imunológica, que é o responsável pela sobrevivência do organismo frente a desafios bacterianos, virais e processos neoplásicos. Estudos em modelos prévios de carcinogênese comprovam a capacidade do P-MAPA em produzir modulação da resposta imune frente a tumores malignos, restaurando a imunocompetência celular, o que ocasiona regressão tumoral e aumento da sobrevida. (FARMABRASILIS 2006)

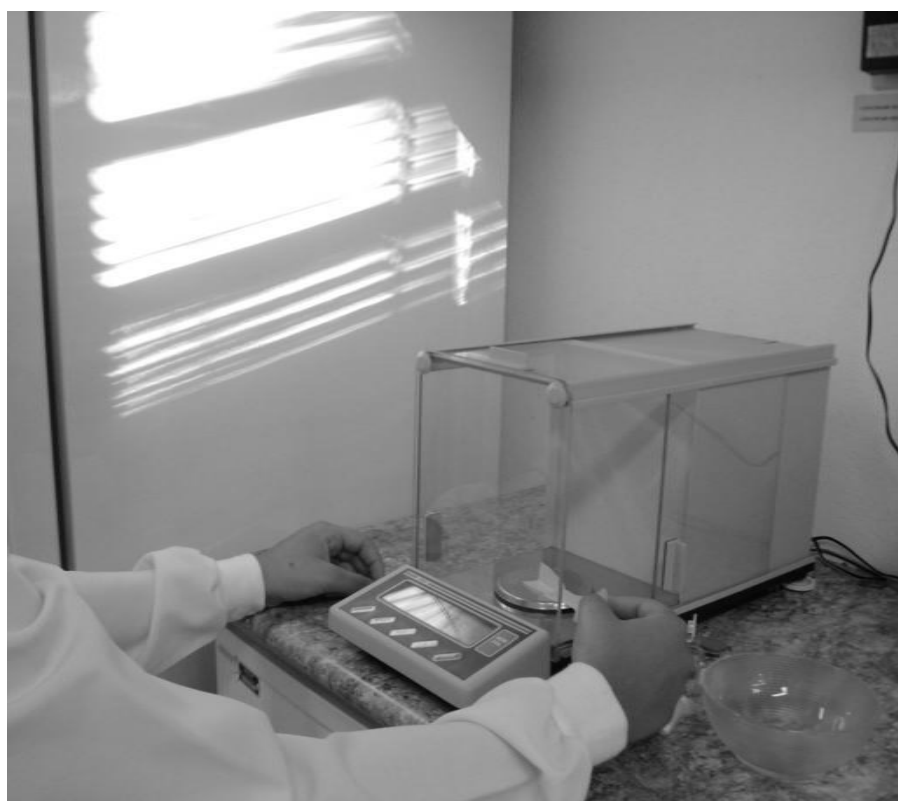


Figura 06 e Figura 07. Imunomodulador P-MAPA e balança para pesagem.

4.3.1 Aplicação do Imunomodulador P-MAPA

O imunomodulador P-MAPA foi aplicado diariamente apenas nos grupos tratados. Foi utilizado 10mg de P-MAPA para cada 1000g correspondentes ao peso do animal, através de cálculo mediante a pesagem dos animais que foi realizada duas vezes por semana em virtude possibilidade de variação do peso. O Imunomodulador era pesado em uma balança de precisão (ADAM EQUIPAMENT, modelo ADA 210/L) acondicionado em vidros específicos para cada animal em temperatura ambiente, diluído em 2mL de cloreto de sódio a 0,9% para aplicação subcutânea na região dorsal com seringa de 10 mL e agulha 0.7X25mm, sendo uma agulha para cada animal .

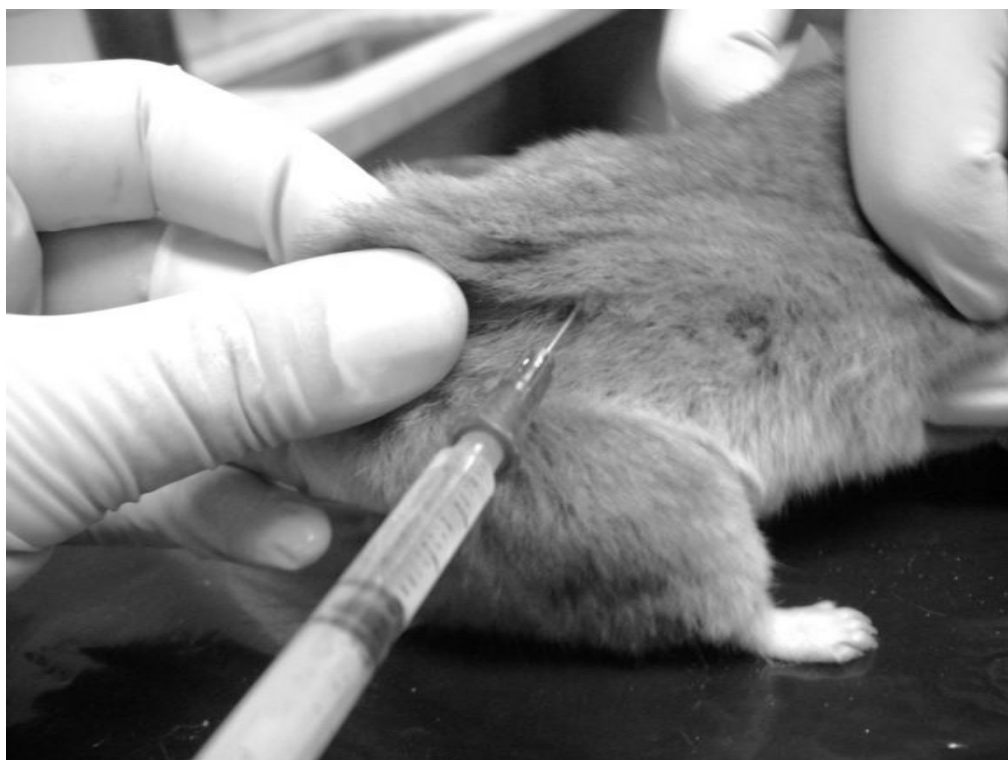


Figura 08. Aplicação do Imunomodulador P-Mapa diluído em soro fisiológico.

4.4 Eutanásia dos animais

Como descrito anteriormente cada grupo amostral era composto por oito animais divididos em três tempos experimentais de 7, 16 e 22 semanas, respectivamente. Os animais foram eutanasiados empregando-se overdose de anestésico associado à relaxante muscular cloridrato de quetamina a 10% e cloridrato de xilazina 0,01 mL/100 g de peso corporal via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada tricotomia da região ventral e necropsia para remoção das bolsas, timo, pulmões, placa de Payer, fígado, baço, rins e fêmur. Os órgãos retirados foram fixados em formaldeído tamponado a 10% por no mínimo 24 h e seguiram pelo procedimento laboratorial de rotina.



Figura 09. Hamster contido para realização de tricotomia da região ventral.

4.5 Avaliação macroscópica

Durante todo o experimento, os animais foram monitorados quanto às alterações comportamentais sendo estas classificadas clinicamente e registradas em relatórios, as modificações macroscópicas foram documentadas fotograficamente, observadas e classificadas de acordo com sua morfologia, a partir das classificações estabelecidas por FASSONI, 1992; LIMA, 1999; CAMARGO, 1999.

4.6 Avaliação Microscópica

As lâminas histológicas foram confeccionadas utilizando-se a coloração de rotina pela hematoxilina-eosina, análise histopatológica foi com auxílio de microscópio óptico, sendo a avaliação baseada no estudo de Bryne et al, 1991 seguindo os critérios de malignidade como grau de queratinização, polimorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão e análise de infiltração tumoral, central e periférica, necrose tecidual induzida pelo tumor, sendo as alterações observadas, diagnosticadas, classificadas e quantificadas em valores numéricos (VN) de acordo com os trabalhos de Fassoni,1992; Salles, 1993; Lima, 1999 para comparação entre os grupos. Os critérios para os valores numéricos foram:

4.6.1. Mucosa Normal (VN=1)

Mucosa bucal do animal revestida por epitélio estratificado pavimentoso, apresentando áreas de variação dos padrões de queratinização.

4.6.2. Hiperplasia (VN=2)

Hiperplasia foi considerada sempre que observava um aumento significativo do número das camadas epiteliais, ultrapassando o número da camada normal.

4.6.3. Displasia e hiperqueratose (VN=3)

Presença de células atípicas com diminuição da coesão celular, aumento do índice núcleo/citoplasma, estratificação epitelial irregular, hipercromatismo, cristas epiteliais irregulares, pleomorfismo e disqueratoses.

4.6.4. Carcinoma Invasivo (VN=4)

Desorganização estrutural, alterações degenerativas, presença de fluido inflamatório e a ocorrência de neoplasia primária metastática.

4.7 Princípios éticos

O protocolo utilizado neste estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela CEEA em 23/04/2009 de acordo com o protocolo 2009-002983.

5. RESULTADOS

As lesões macroscopicamente DMBA induzidas nos grupos controles foram significativamente mais agressivas quando comparadas aos grupos tratados, uma vez que os processos neoplásicos são frequentemente acompanhados por uma concomitante imunossupressão independentemente da localização e etiologia do tumor. Além disso, ao nível microscópico, para os grupos controles, observou-se maior quantidade de células atípicas com constatação de carcinomas invasivos apenas para o grupo controle e menor quantidade de células ativas do sistema imune quando comparados aos grupos tratados comprovando a atividade imunomoduladora do fármaco P-MAPA frente a processos neoplásicos. Para melhor interpretação dos dados, abaixo têm-se gráficos com scores, relacionando as principais alterações observadas estabelecidas por outros trabalhos agregando valores numéricos (VN) para as alterações, já mencionados acima para os grupos nos diferentes tempos experimentais 7, 16 e 22 semanas.

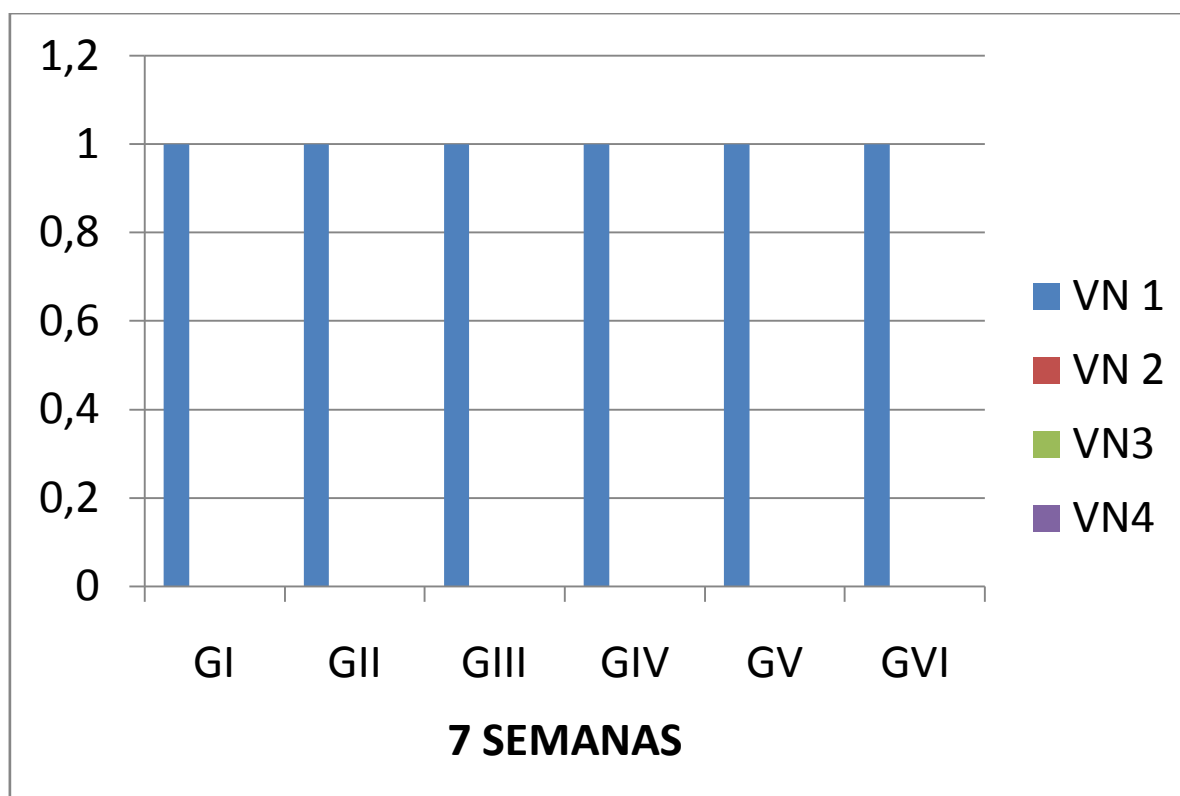


Gráfico 1. Valores expressos para o período de 7 semanas de indução da carcinogênese. Valor numérico (VN) correspondente a 1 para todos os grupos.

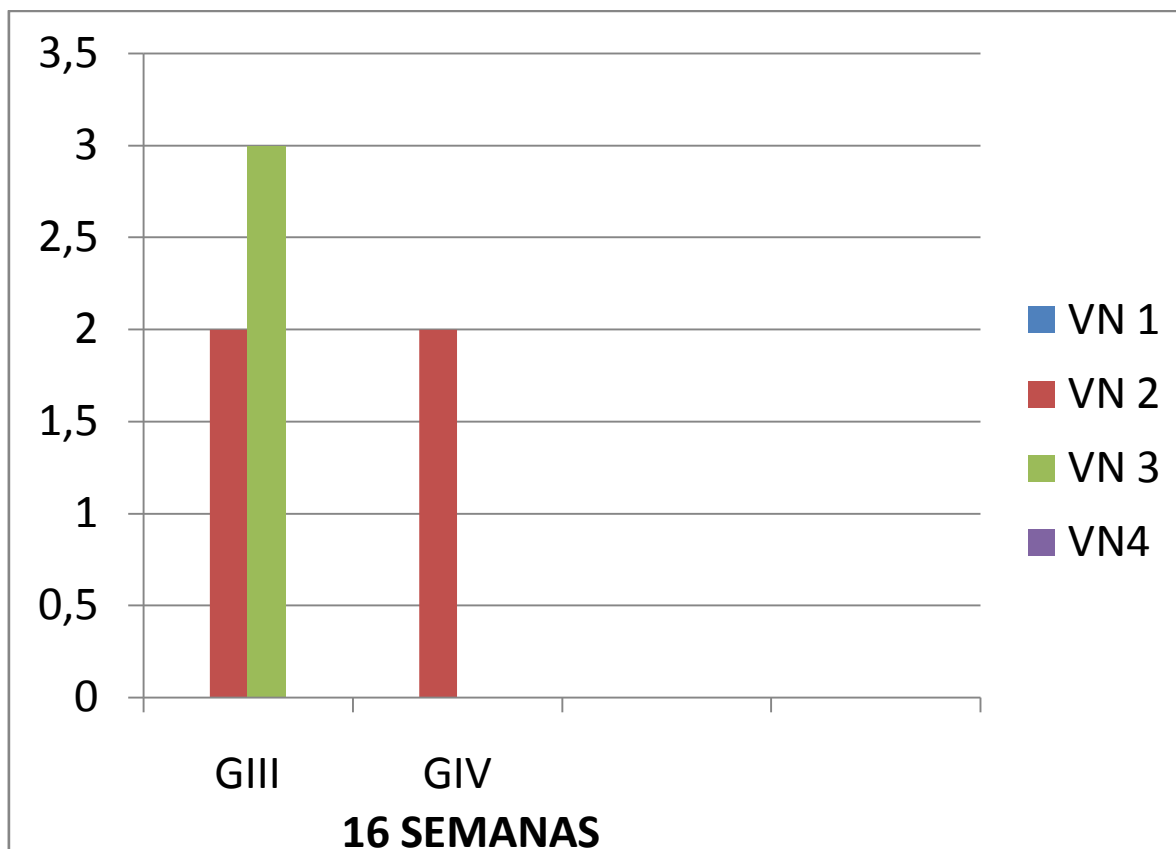


Gráfico 2. Valores expressos para o período de 16 semanas de indução da carcinogênese .Valor numérico (VN) correspondente a 2 para o grupos IV , e valores numéricos correspondentes a 2 e 3 para os grupos III .

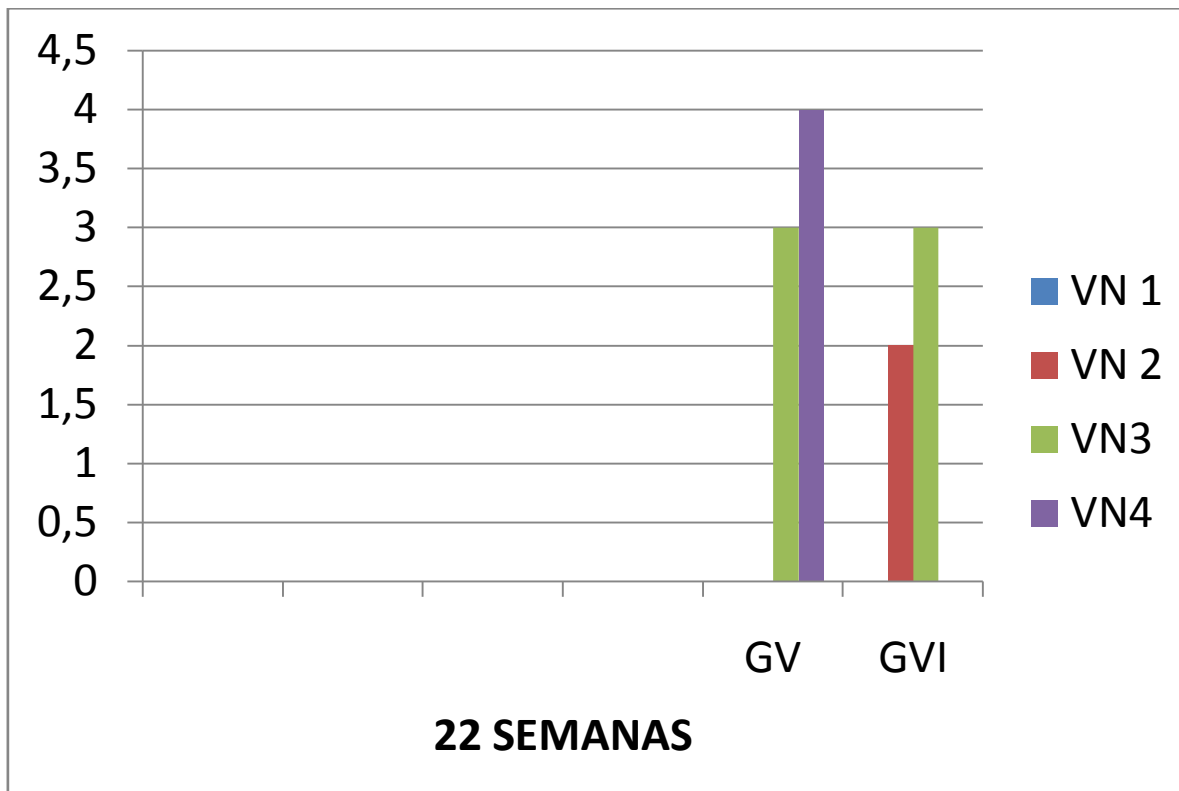


Gráfico 3. Valores expressos para o período de 22 semanas de indução da carcinogênese .Valor numérico (VN) correspondente a 2 e 3 para o grupo VI, e valores numéricos correspondentes a 3 e 4 para o grupo V.

5.1 Aspectos Macroscópicos e Microscópicos

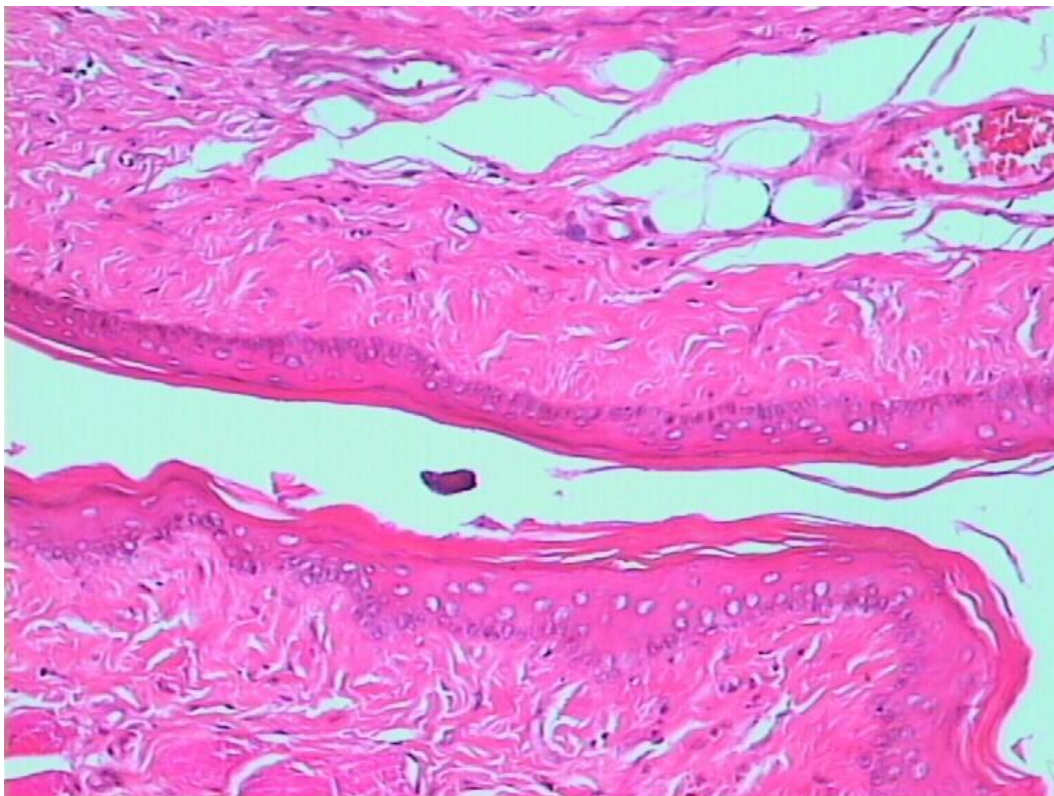


Figura 10. Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais no período de 7 semanas grupo I e II onde observa se epitélio íntegro.(Coloração H.E)



Figura 11. Aspecto da mucosa bucal dos animais no período de 7 semanas onde observa se padrão de normalidade.

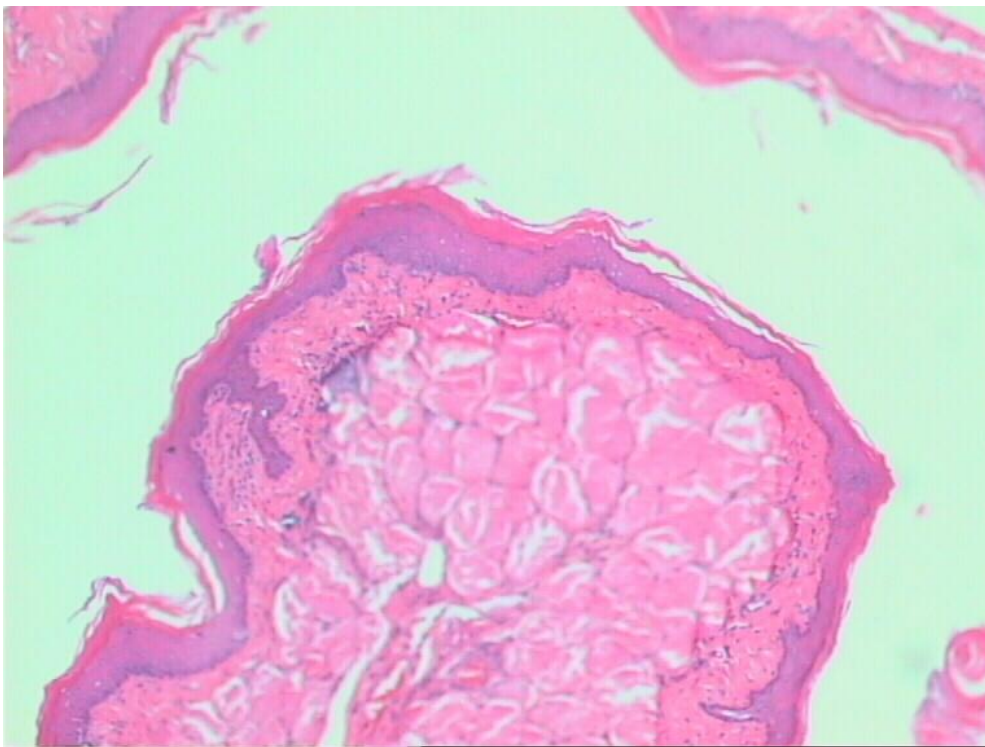
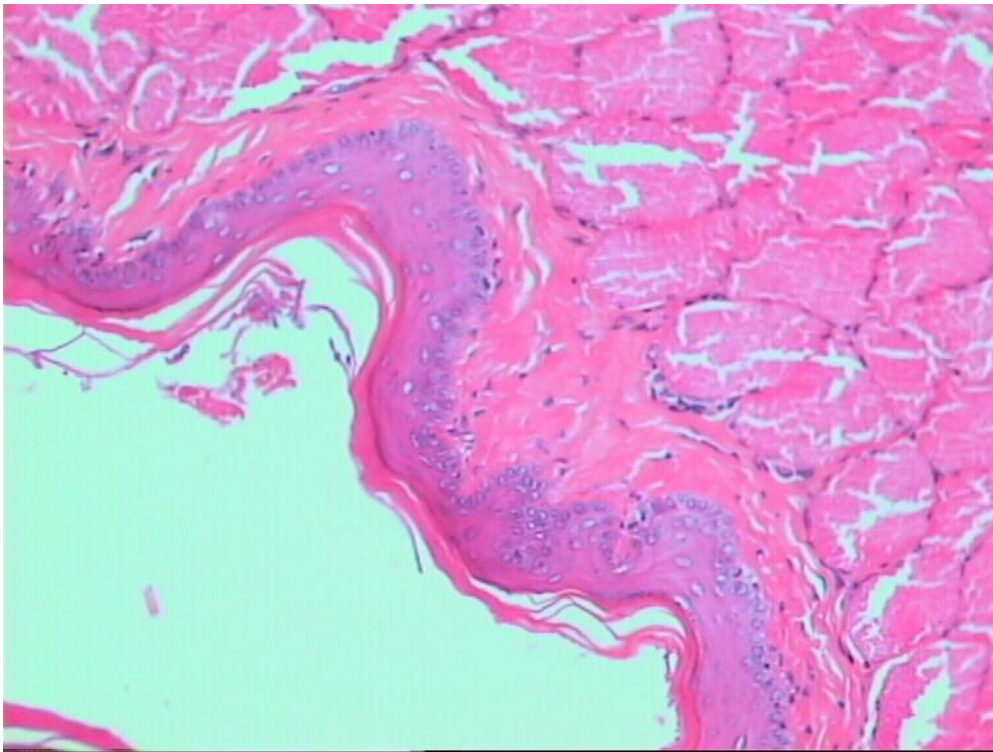


Figura 12 e Figura 13 . Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais do grupo IV que receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 16 semanas, destaca se leve hiperplasia epitelial.(Coloração H.E)

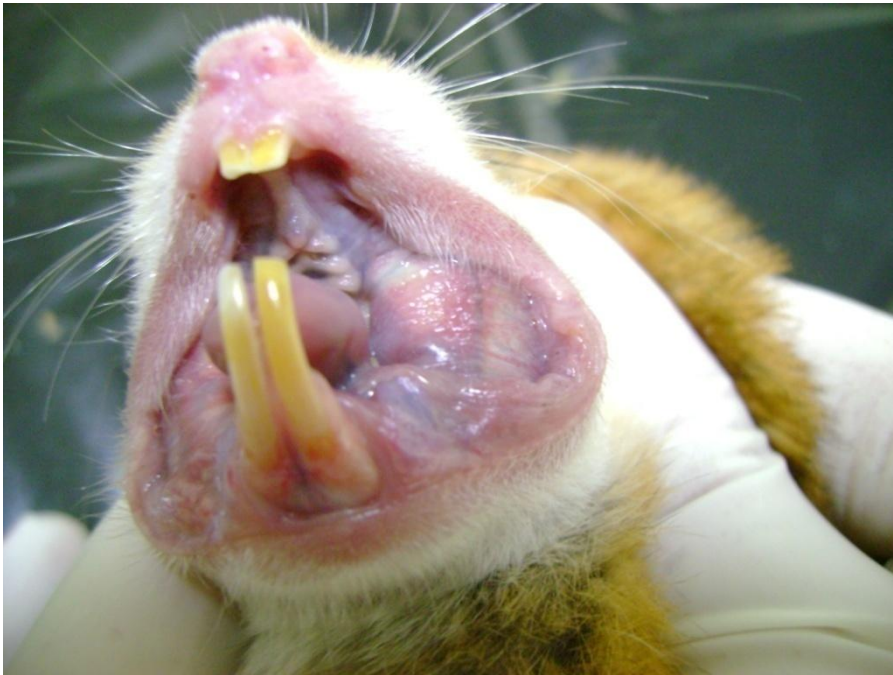


Figura 14 e Figura 15 . Aspecto clínico dos animais do grupo IV e grupo VI que receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 16 semanas, não destaca se alterações macroscópicas.

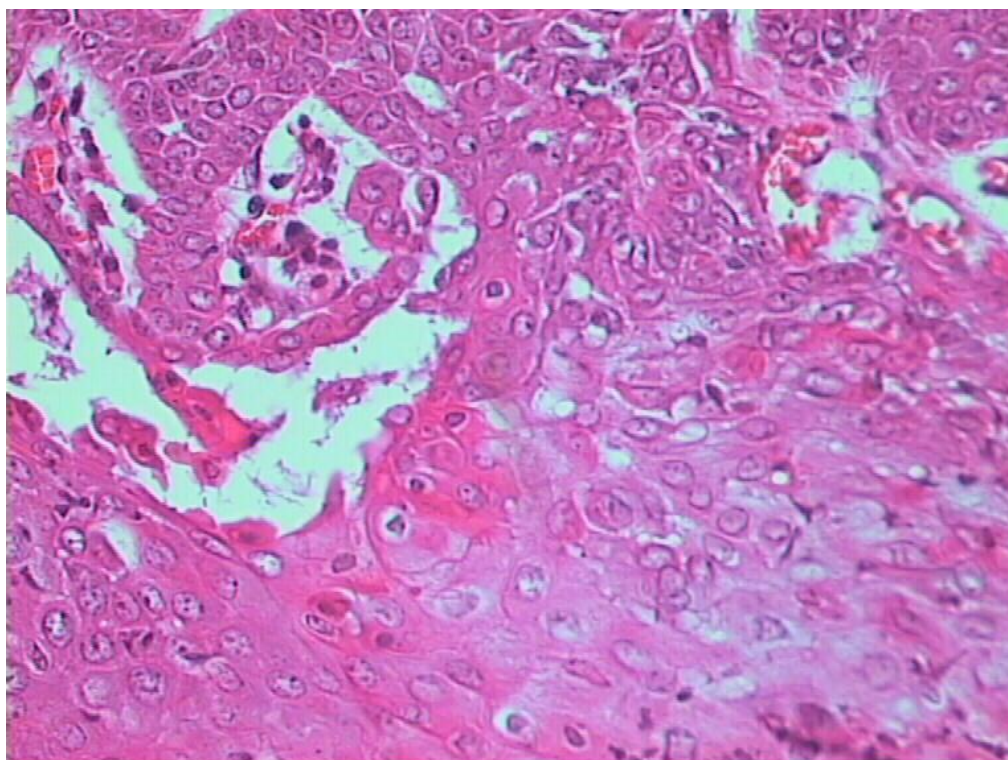


Figura 16. Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais do grupo III que não receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 16 semanas destaca disqueratose, hiper cromatismo nuclear, pleomorfismo. (Coloração H.E)



Figura 17 e Figura 18. Aspecto da mucosa bucal dos animais do grupo III e V que não receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 16 semanas e aspecto externo com lesão ulcerada.

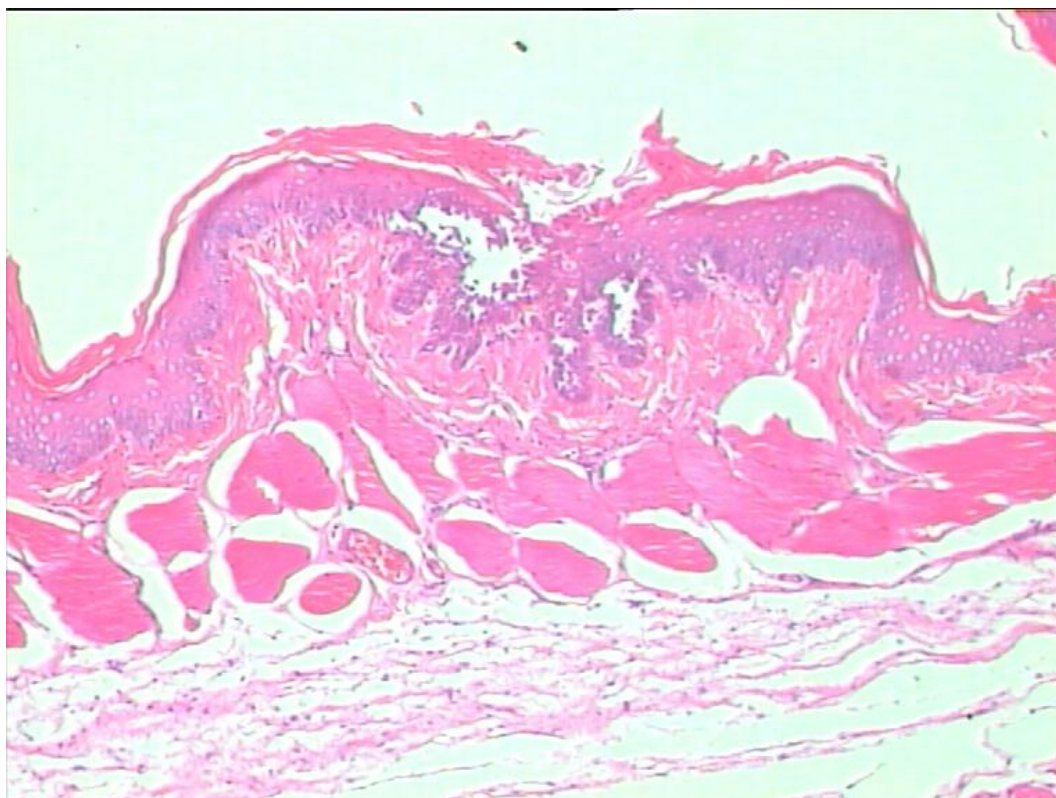


Figura 19. Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais do grupo III que não receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 16 semanas destaca se descontinuidade epitelial, perda de integridade e invasão de ilhotas para lâmina própria e tecido conjuntivo. (Coloração H.E)



Figura 20. Aspecto clínico bucal dos animais do grupo V que não receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 16 semanas lesão papilomatosa.

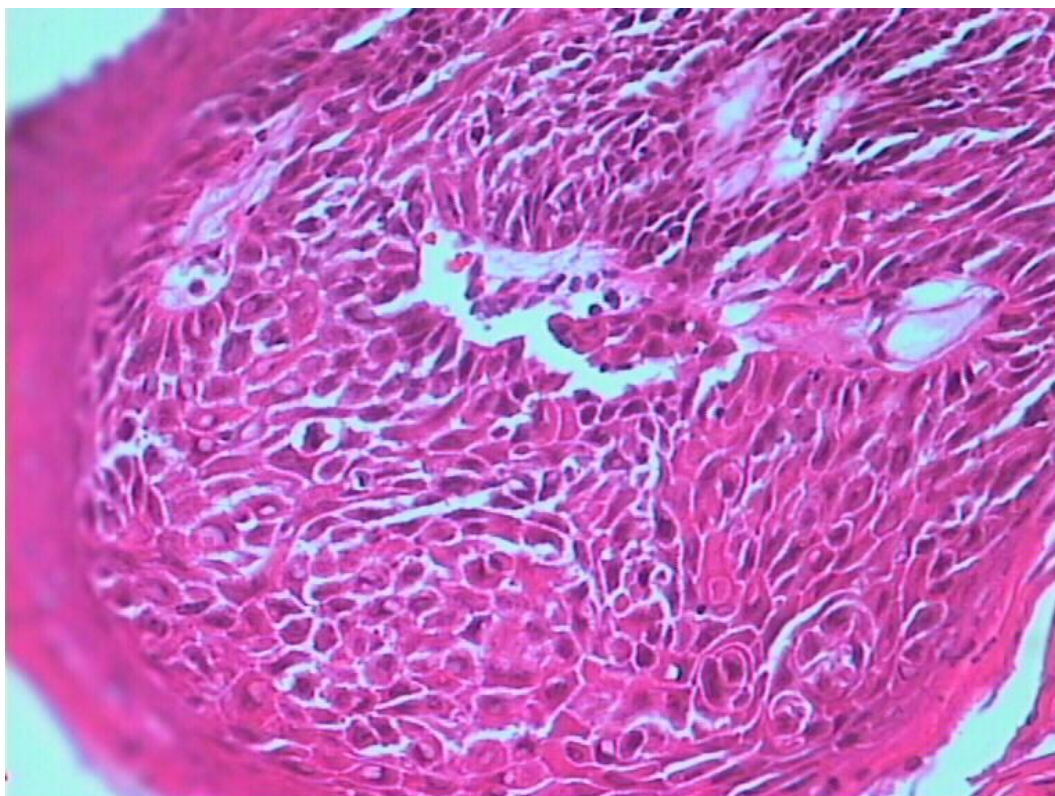


Figura 21. Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais do grupo III que não receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 16 semanas observa se células atípicas, pleomorfismo e hiperchromatismo nuclear (Coloração H.E)

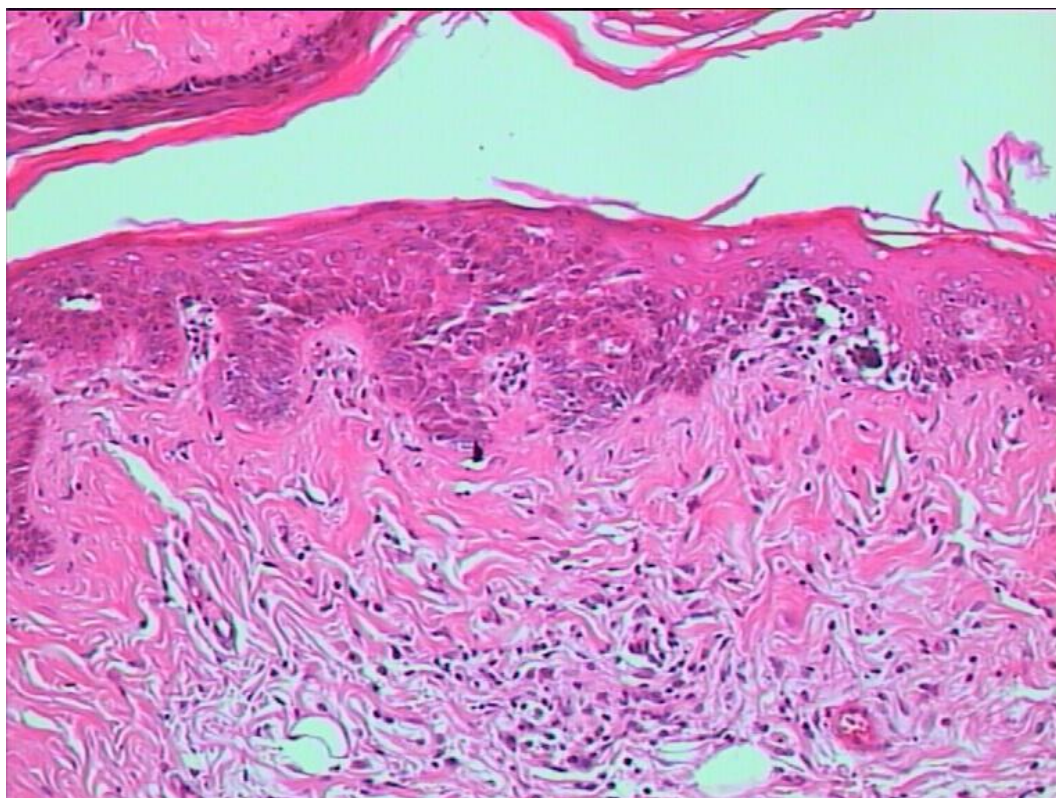


Figura 22. Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais do grupo VI que receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 22 semanas, presença de displasia moderada. (Coloração H.E)



Figura 23. Aspecto clínico bucal dos animais do grupo VI que receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 22 semanas, presença de lesões peribucais.

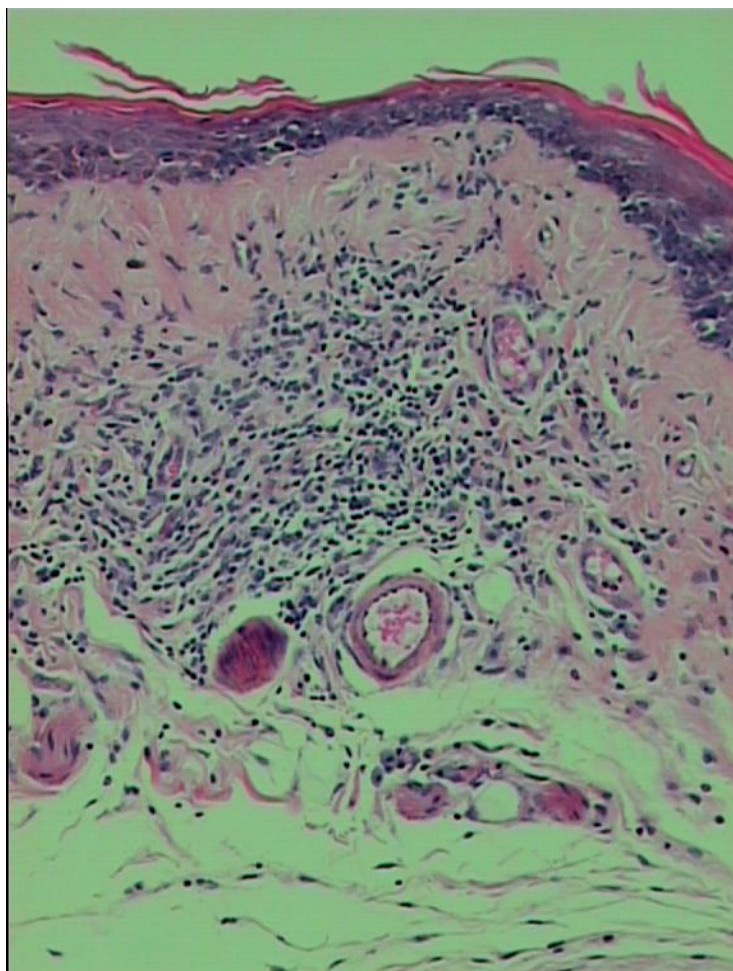


Figura 24. Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais do grupo VI que receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 22 semanas, presença de hiper Cromatismo nuclear. (Coloração H.E)

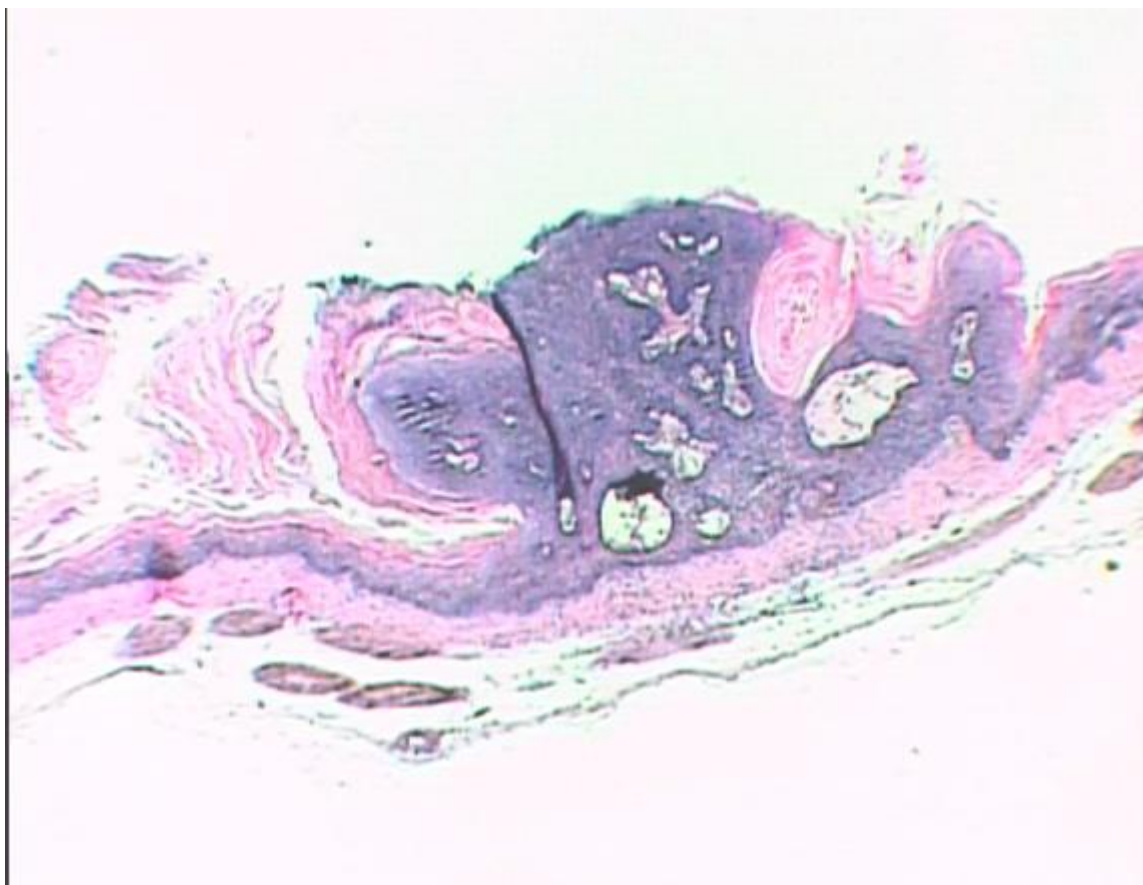


Figura 25. Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais do grupo V que não receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 22 semanas observa se carcinoma espinocelular papiliforme (Coloração H.E)

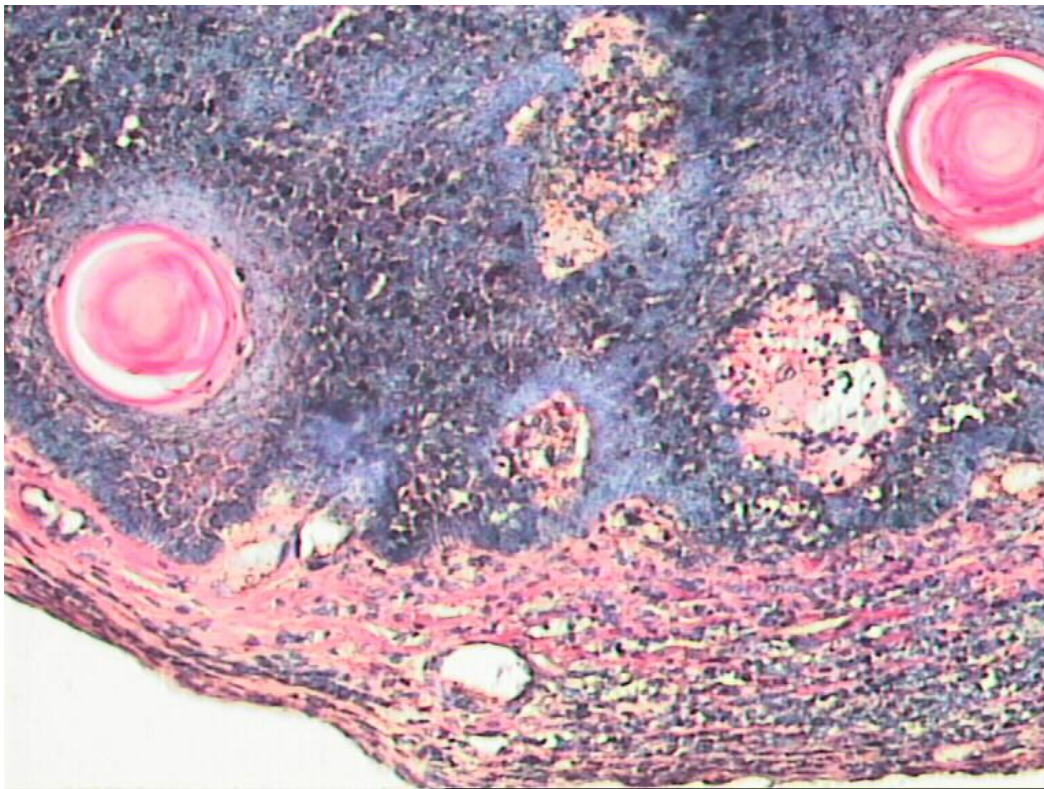
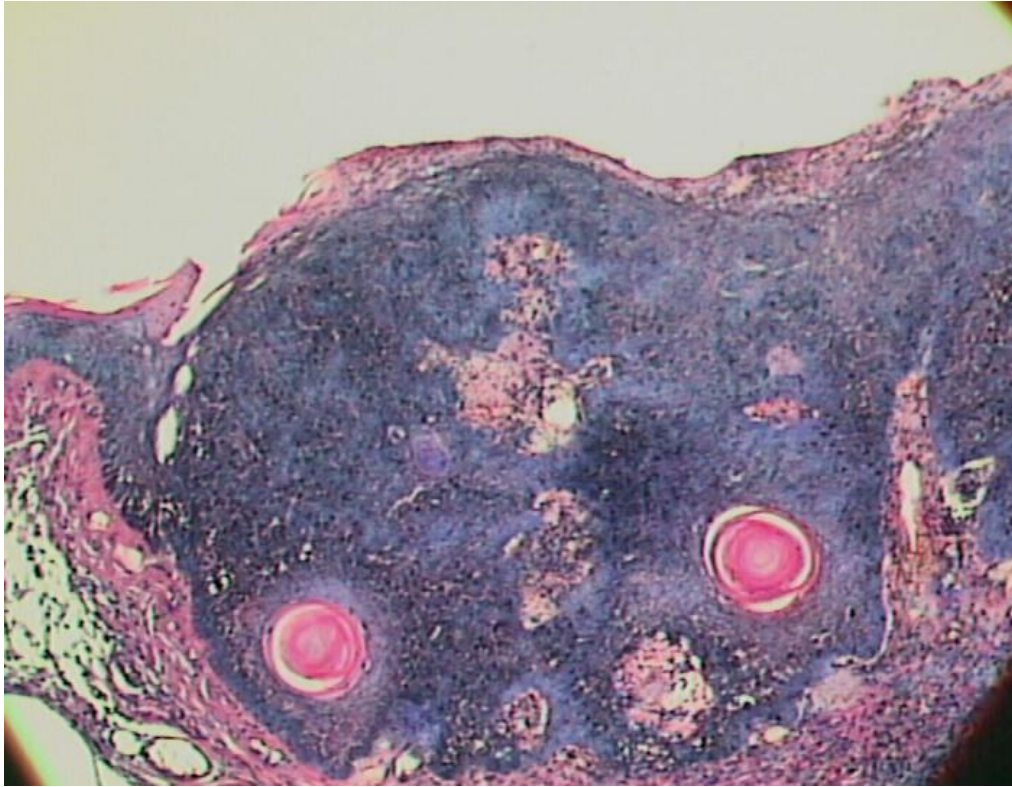


Figura 26 e Figura 27. Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais do grupo V que não receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 22 semanas observa se intenso pleomorfismo, perda de adesão celular, invasão de células tumorais no tecido conjuntivo, mitoses atípicas. (Coloração H.E)

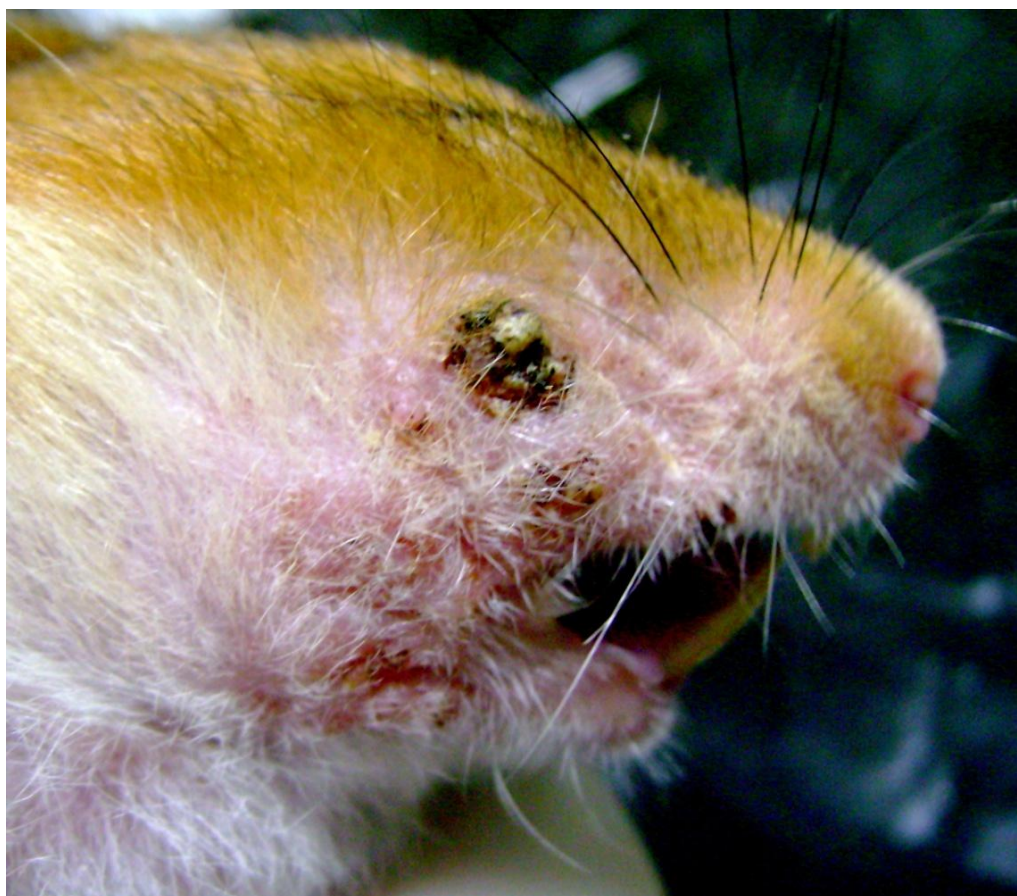


Figura 28 e Figura 29. Aspecto clínico bucal dos animais do grupo V que não receberam o imunomodulador P-MAPA no período de 22 semanas observa se lesões ulceradas, com sangramento.

6. Discussão

A ocorrência do câncer não se mostra dependente de um determinado fator de risco atuando isoladamente, mas sim decorrente da associação de fatores, que podem atuar em maior ou menor grau, interferindo com os estádios de hemostasia e provocando lesões celulares irreversíveis no DNA das células, desenvolvendo as neoplasias.

Recentemente pesquisadores obtiveram indícios da conexão entre inflamação e câncer, através dos estudos clínicos o que mudou diversos conceitos sobre o entendimento do metabolismo do câncer. Como se sabe, o câncer começa com uma série de mudanças genéticas induzidas vírus, drogas, radiações, que atacam um ou mais grupos de células, tornando-as com excessiva capacidade de reprodução e, assim, invadem tecidos vizinhos, onde tem início a malignidade.

Outro fato importante na imunologia dos tumores se refere ao fator de necrose tumoral, descoberto no final da década de 90, em que esta citocina quando administrada diretamente no tumor induzia a morte das células cancerosas. Entretanto, pesquisas recentes demonstraram que quando a presença do TNF se tornasse crônica no tumor, sua ação era ao contrário do que se previa. A explicação é de que o gene produtor do TNF se desligava e dessa forma não se produzia mais TNF (afinal havia alguma concentração no tumor) e por essa razão o tumor não se contraía ou retraía (KATIYAR 1997, MUKHTAR 1997).

Em virtude desse aspecto a imunoterapia surge como uma forma coadjuvante de tratamento aumentando a sobrevida e potencializando a resistência do organismo. Observamos que os grupos tratados com P-MAPA estavam sempre atrasados em relação à evolução da carcinogênese. Porém mais estudos e pesquisas devem ser realizados com objetivo de compreender e entender o sistema imunológico e a patogênese do câncer (KOWALSKI 1999, DIB 1999, IKEDA 1999, ADDE 1999, REGEZI 1999.)

O imunomodulador P-MAPA, cujas propriedades benéficas para o sistema imune são conhecidas demonstrou resultados positivos frente ao câncer bucal neste modelo experimental. Foram notórias as diferenças entre os grupos tratados e controles, pois os grupos controles desde a décima sexta semana já apresentavam padrões de malignidade, atipia e desordem epitelial, que não foi observado nos grupos tratados. A utilização de modelos experimentais como suporte a inúmeras pesquisas que objetivem o estudo de substâncias que possam frear o desenvolvimento do câncer humano é um caminho muito explorado, mas não completamente elucidado.

E baseado em diversas análises na literatura identificamos trabalhos que se preocupavam não somente em substâncias que causariam câncer, e sim efetuar um papel preventivo. Devido ao desenvolvimento do P-MAPA e a ausência de trabalhos científicos que pudessem avaliar clinicamente o efeito nas neoplasias bucais, é que fundamentamos nosso trabalho.

7. Conclusão

Pôde - se concluir que:

Morfologicamente é mais notória a comparação entre os grupos após o período de 16 semanas, em virtude da relevância das alterações oriundas da carcinogênese DMBA induzida.

O imunomodulador P-MAPA desempenha efeito protetor no desenvolvimento dos tumores bucais DMBA induzidos.

8. Referências Bibliográficas

01. ALBERT, B. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. 775 p.
02. AL- DAMOUK, J. D. Oral epithelial response to experimental chronic alcohol ingestion in hamsters. *Oral Surg Med Oral Pathol*, SAINT Louis, v. 76, n. 6, p. 736-741, Dec. 1993.
03. BALASENTHIL, S. et al. Chemopreventive potencial of neem (*Azadirachta indica*) on 7, 12-dimethyl[a]antracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J Ethnopharmacol*, Lausanne, v.67, n.2 p. 189-195, Feb 1999.
04. BALASENTHIL, S.; NAGINI, S. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]antracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. *Oral Oncol*, Oxford, v. 36, n. 4, p. 382-386, Apr. 2000.
05. BALASENTHIL, S.; RAO, K. S.; NAGINI, S. Altered cytokeratine expression during chemoprevention of experimental hamster buccal pouch carcinogenesis by garlic. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 31, n. 3, p. 142-146, Mar. 2002.
06. BOONE, C. W.; YOU, M. Progress in cancer chemoprevention: agents. *J Cell Biochem Suppl*, New York, v.27, n. 6/7, , 1997
07. CAMARGO, W. R. Análise do potencial carcinogênico de dentifrício com peróxido de hidrogênio e de agente clareador dentário: avaliação clínico-macroscópica em hamsters no modelo de carcinogênese bucal DMBA-induzida. 1999. 116 p Tese (Doutorado em odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1999.
08. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins – patologia estrutural e funcional. 6. Ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2000. 1251 p.

09. DERKA, S. et al. Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. *Oral Oncol*, Oxford, v. 42, n. 5, p. 540-550, May 2006.
10. www.farmabrasilis.org.br
11. FASSONI, A. A. Carinogênese bucal química DMBA-induzida. Estudo metodológico em hamsters sírios dourados. 1992. 87 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1992.
12. HOSSIER, G. L.; Mc PHERSON, C. W. *Laboratory hamsters*. London: Academic Press, 1987. 163 p.
13. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa da incidência de câncer no Brasil 2007. <http://www.inca.gov.br/estimativa2007>
14. KATYIAR, S. K.; MUKHTAR, H. Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl*, New York, v. 27, p. 59-67, 1997.
15. KOWALSKI; Luiz Paulo, Marchioni; Dirce Maria Lobo, Fisberg; Regina Mara, Dietary factors and oral cancer: a case-control study in Greater Metropolitan São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública* vol.23 no.3 Rio de Janeiro Mar. 2007.
16. KOWALSKI LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C. Prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer bucal. *Hospital do Câncer & Associação Paulista de Cirurgiões dentistas*. São Paulo: Frôntis Editorial;1999.
17. LIMA, N. L. Estuda das alterações morfológicas causadas pela indução concomitante de DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor, na carcinogênese química bucal. 1999. 188 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1999.
18. LIMA, S. R. M. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera Multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res*, London, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, Nov. 2003.

19. LORO, L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 32, n. 3, p. 125-138, Mar. 2003.
20. MANJANATHA M. G. dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7, 12-dimethyl[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue transgenic rats. *Carcinogenesis*, New York, c. 27, n.12. p. 2555-2564, Dec. 2006.
21. MANOHARAN, S. et al. Evaluation of anticarcinogenic effects of Clerodendron inerme on 7, 12-dimethyl[a]anthracene- induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J*, Singapore, v. 47, n. 12, p. 1038-1043, Dec. 2006.
22. MESQUITA, A. T. M. et al. Estudo das alterações morfológicas causadas pela uretana em método de carcinogênese bucal DMBA-induzida. *R Fac Odontol Porto Alegre*, Porto Alegre, v. 44, n. 1, p. 31-35, Jul. 2003.
23. MILLER, E. G. et al. Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by green coffee beans. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, Saint Louis, v. 65, n. 6, p. 745-749. June 1989.
24. MOHAN, K. V. P. C. et al. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of lactoferrin and Black tea polyphenol combination on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v. 1760, n. 10 p. 1536-1544, 2006.
25. NASHINO, H. Cancer prevention in natural carotenoids. *J Cell Biochem Suppl*, New York, v. 27, p. 86-91, 1997.
26. PARISE JR., O. O câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos São Paulo: Sarvier, 200. 256 p.
27. PIEROLI, D. A. Análise quantitativa das regiões organizadoras nucleolares(NoRs) em carcinomas epidermóides desenvolvidos em hamsters a partir do modelo DMBA-INDUÇÃO com agentes clareadores dentais. 2003. 86 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2003.

28. REGEZI J. A.; SCIUBBA J. Oral pathology clinical-pathologic correlations. 3ed. Philadelphia: WB.Saunders Company; 1999.
29. SALLEY JOHN J. EXPERIMENTAL CARCINOGENESES IN DE THE CHEEK POUCH OF THE SYRIANE HAMSTER , 1954.
30. SANTOS, B. F; GOLPALAKRISSHNAKONE, P.; IGNACIMUTHU, S. Anti-tumor promoting potencial of luteolin against 7, 12-dimethiyl[a]antracene-induced mammary tumors in rats. Chem Biol Interact, Amsterdan, v. 164, n. 1/2, p. 1-14, Dec. 2006
31. SLAGA, T. J.; GIMENEZ-CONTI, I. B. An animal model for oral cancer. J Natl Cancer Inst Monogr, Bethesda, v. 13, p. 55-60, 1992.
32. SOUSA., A. C. Garcia de, GENETIC ALTERATIONS AND ORAL CANCER - A SHORT REVIEW; Rev. Brasileira de Patologia Oral; Mar.2004.
33. THOMAS, M. A.; SPENCER, J. F.; WORLD, W. S. Use of the Syrian hamster as an animal model for oncolytic adenovirus vectors. Methods Mol Med, Totowa, v. 130, p. 169-183, 2007.
34. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition of leukoplakia and related lesion: an aid to studies on oral precancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, Saint Louis, v. 46, n. 4, p. 518-539, Oct. 1978.