

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Gustavo Morelli

**Carcinogênese Bucal DMBA Induzida com Aplicação de
Imumonomodulador P-MAPA. Análise histomorfométrica.**

Araçatuba - 2010

**Carcinogênese Bucal DMBA Induzida com Aplicação de
Imumonomodulador P-MAPA. Análise histomorfométrica.**

Gustavo Morelli

Araçatuba-SP

2010

Carcinogênese Bucal DMBA Induzida com Aplicação de Imumonomodulador P-MAPA. Análise histomorfométrica.

Trabalho de Conclusão de Curso como parte de requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Orientador: **Prof.^a Ass. Dr.^a Renata Callestini Felipini**

Araçatuba- SP

2010

Epígrafe

*“ Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite
que ele possa ser realizado. ”*

(Roberto Shinyashiki)

Dedicatória

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso a todos os meus familiares, em especial ao meu pai **Mario Antonio Morelli** e minha mãe **Maria Paula dos Santos Morelli** , a minha querida Irmã **Tatiana Morelli** e sua família e a minha companheira **Karina Moraes Faria** , com muito amor, apoio e sempre presentes em todos os momentos, me deram força para atingir os meus objetivos, agregar conhecimento e sonhar cada vez mais alto e assim poder contribuir, ainda que pouco, com o conhecimento científico através da pesquisa e de muito trabalho. Tudo isso foi fundamental para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Professora Doutora Renata Callestini Felipini que permitiu, através de sua orientação, acrescentar conhecimento maior sobre a área de estudo, manifestando maior interesse no crescimento científico e profissional dos estagiários.

Agradeço a todos os professores integrantes do departamento de Patologia e também a todos os funcionários em especial ao Marcelinho que tanto nos ajudou para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Iseu Nunes por ter nos fornecido o imunomodulador (P-MAPA) e nos considerar parte integrante da comunidade científica da Farmabrilis.

Agradeço também a edição da Revista UNESP-CIÊNCIA pela publicação parcial desse trabalho, e ainda, agradeço aos professores ao qual de um modo muito especial aceitaram o meu convite de participarem da Banca Examinadora, permitindo alguns minutos de seu tempo para minha exposição do trabalho.

Minha gratidão!

Resumo

A incidência do câncer de boca é extremamente variável, sendo em muitas partes do mundo um problema de saúde pública. Os carcinomas espinocelulares são as neoplasias orais mais freqüentes, constituindo cerca de 90% dos casos, seguidos por outros carcinomas como os verrucosos e indiferenciados, e tumores de pequenas glândulas salivares, sarcomas e raramente, por melanoma maligno. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer de boca é o oitavo de maior incidência no Brasil. A cada ano surgem mais de dez mil novos casos. As principais causas das neoplasias são atribuíveis a influências ambientais, particularmente aquelas relacionadas ao estilo de vida, uso cotidiano e regular do álcool e do tabaco, má higiene bucal, deficiências imunológicas, exposição ao sol sem proteção e predisposição genética são os principais fatores que levam as neoplasias bucais. 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 Benzotraceno (DMBA) através de análise histomorfométrica das lesões quimicamente induzidas na região de bolsa intrabucal. Foram utilizados 48 hamsters sírius dourados (*Mesocricetus auratus*) sendo 24 machos e 24 fêmeas com 60 dias e um peso corporal médio de 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. Ao final de cada tempo estabelecido por grupo, os animais foram eutanasiados empregando-se overdose de anestésico (cloridrato de quetamina a 10%) e relaxante muscular, via intraperitoneal. A análise histológica sempre se baseou no reconhecimento das formas dos componentes estruturais dos tecidos. Essa análise descritiva tem sido muito importante para definir padrões morfológicos, embora seja bastante subjetiva sendo a análise histomorfométrica uma das mais precisas e indicadas para estudar esses tipos de lesões, assim foi utilizado dessa técnica para comparar o desenvolvimento e agressividade dos tumores nos grupos tratado e controle. O programa utilizado para análise foi o “Image-Pro Plus 6”. Obtivemos resultados expressivos em relação aos grupos tratados e controles, principalmente durante o período da 22ª semana em que os grupos controle exibiram quadros de carcinomas invasivos e os tratados apenas quadros de hiperplasia moderada com poucos sinais de atipia observados no estudo histomorfométrico.

Palavras-Chaves: Neoplasia, *hamsters sírius dourado*, P-MAPA, Histomorfometria

Abstract

The incidence of oral cancer is extremely variable and in many parts of a public health problem. Squamous cell carcinomas are the most frequent oral cancer, constituting about 90% of cases, followed by others such as verrucous carcinoma and undifferentiated, and small salivary gland tumors, sarcomas and rarely, malignant melanoma. According to the National Cancer Institute (INCA), oral cancer is the eighth highest incidence in Brazil. Every year there are over ten thousand new cases. The leading causes of cancer are attributable to environmental influences, particularly those related to lifestyle, and regular daily use of alcohol and tobacco, poor oral hygiene, immune deficiencies, exposure to sun without protection, and genetic predisposition are the main factors that lead oral neoplasms. The aim of this study was to evaluate the immunomodulating effects of the drug P-MAP in experimental carcinogenesis induced in golden hamster sirius 7-12 hydrocarbon-Dimethyl Benzatraceno (DMBA) by histomorphometric analysis of chemically induced lesions in the region of intraoral pouch. A total of 48 golden hamsters sirius (*Mesocricetus auratus*) were 24 males and 24 females with 60 days and a mean body weight of 100 grams. The animals were divided into six groups: three treated groups and three control groups, with 8 animals in each group, corresponding to three experimental periods in the range of 7, 16 and 22 weeks. At the end of time set by each group, animals were euthanized employing overdose of anesthetic (ketamine hydrochloride 10%) and muscle relaxant, intraperitoneally. Histological analysis was founded on the recognition of forms of structural components of tissues. This descriptive analysis has been very important to define morphological patterns, although it is very subjective and a histomorphometric analysis of the most accurate and suitable for studying these types of injuries, so this technique was used to compare the development and aggressiveness of tumors in the treated group and control. The program used for analysis was "Image-Pro Plus 6." We achieved significant results in relation to the treated groups and controls, especially during the 22nd week in the control group showed pictures of invasive carcinoma and those treated only pictures of moderate hyperplasia with few signs of atypia observed in histomorphometric study.

Key Words: Neoplasm, golden hamsters sirius, P-MAP, Histomorphometry

Sumário

	Página
I. Introdução e Justificativa_____	01
II. Revisão de Literatura _____	04
III. Proposição_____	06
IV. Material e Métodos_____	07
V. Resultados_____	17
VI. Discussão_____	21
VII. Conclusão_____	22
VIII. Referências Bibliográficas_____	23
IX. Anexos_____	27

Lista de Gráfico/Tabela

	Página
Gráfico-01_____	17
Tabela_____	27

Lista de Figuras

	Página
Figura-01_____	07
Figura-02_____	08
Figura-03_____	09
Figura-04_____	10
Figura-05_____	11
Figura-06 e 07_____	12
Figura-08 e 09_____	13
Figura-10 e 11_____	15
Figura-12,13 e14_____	16
Figura-15 e16_____	18
Figura-17,18 e 19_____	19
Figura-20_____	20

1. Introdução

O câncer causa cerca de 13% de todas as mortes no mundo sendo a etiologia das neoplasias multifatoriais (INCA 2007). 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)

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). Dentre todas as formas de neoplasias que afetam o corpo humano, as relacionadas à cavidade bucal apresentam significativa prevalência, representando 3 a 5% de todas as neoplasias. (PARISE JR., 2000). O câncer oral afeta principalmente os homens, com uma relação de gênero em torno de 10:1. As diferentes taxas de incidência que ocorrem em distintas regiões permitem supor que fatores ambientais influenciam os padrões de ocorrência da doença. 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 (papilomavírus humano-HPV; fungo *Candida albicans*), irritação mecânica crônica (uso de próteses mal adaptadas, ação de bordas cortantes dos dentes sobre a mucosa bucal), a radiações 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.)

A importância de entender a patogênese do câncer bucal é relevante, a boca está constantemente submetida a substâncias, agentes físicos com potencial carcinogênico e traumas, entre os agentes químicos, aqueles presentes no fumo são os que merecem maior destaque, correspondendo à cerca de 85-90% dos casos (Parise 2000, NISHINO 1997).

Desta forma, 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 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).

O modelo Hamster Sirius Dourados (*Mesocricetus auratus*) utilizados em grupos experimentais de carcinogênese bucal 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-DAMOUK 1993, BALASENTHIL 1999, HOSSIR 1987, MILLER 1989, NAGINI 2002, PIEROLI 2003, RAO 2002, SANTOS 2002, SLAGA 1992, THOMAS 2007).

As pesquisas recentes apontam na direção de fármacos que interfiram na inibição do desenvolvimento tumoral, que aumentem a sobrevivência de pacientes portadores de neoplasias malignas; como exercer ação sobre a viabilidade das células tumorais no combate imunológico. 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. Esta capacidade do produto para reverter ou minimizar *in vivo* o quadro de deficiência imunológica associada à infecção mostrou-se capaz em experimentos controlados proporcionam proteção para os hospedeiros frente a inoculação experimental de doses letais de agentes infecciosos, resultando em altas taxas de sobrevivência e cura. Em vista destas 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 adjuvante em doenças infecciosas causadas por microorganismos intracelulares tais como malária, leishmaniose e tuberculose.(FARMABRASILIS, 2006)

2. Revisão de Literatura

A experimentação animal nas pesquisas científicas tem contribuído de sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de enfermidades que acometem os seres humanos.

O *Hamster Sirus Dourados*, é muito popular em laboratórios do mundo inteiro, os motivos que fazem esta variedade a preferida pelos pesquisadores são a sua docilidade, boa disposição e fácil adaptação ao cativeiro.

Os Hamsters são prolíferos, fáceis de criar e resistentes às infecções, o que os torna úteis e convenientes em condições experimentais. Se colocados em gaiolas confortáveis e apropriadas, e tratados com delicadeza, os hamsters são animais dóceis. Dormem durante o dia, mas à noite são ativos e precisam de espaço para se exercitar. Gostam de brincar em “rodas” para exercício. As “bolsas faciais” e sua cauda curta e grossa diferenciam o hamster dos outros animais de laboratório. As bolsas são de grande valor para os pesquisadores, uma vez que parte do seu sistema circulatório é bastante superficial, permitindo um excelente estudo da circulação.((AL-DAMOUK 1993, BALANSENTHIL 1999, HOSSIR 1987, MILLER 1989)

O uso de hamster no laboratório é semelhante aos demais roedores. Mas são menos utilizados porque suas reações não são ainda bem conhecidas. O hamster tem reações mais específicas em relação a determinados experimentos. Por exemplo, aqueles que envolvem o crescimento de tumores cancerosos. Além das pesquisas com câncer, o hamster é utilizado nas pesquisas do diabetes e radiação, e em estudos sobre fisiologia vascular.

O câncer representa uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo, o que o torna alvo de inúmeras pesquisas. Assim, atualmente se busca cada vez mais entender as etapas que compõem o processo de carcinogênese. Sob este aspecto, os trabalhos que tentam reproduzir experimentalmente tais etapas fornecem uma fonte inesgotável de conhecimento.(FISBERG, 2007, KOWALSKI, 2007)

Nesse contexto, a partir da década de vinte, começou-se a pesquisar o processo de carcinogênese em animais de laboratório. Porém, somente em 1954, com o trabalho de Salley¹⁴, foi desenvolvido um modelo em boca realmente eficaz. Nos anos seguintes, algumas modificações foram sugeridas, sendo as propostas por Morris¹⁰ (1961) e Fujita ET al.⁵ (1973) as mais importantes. Hoje, em virtude dos trabalhos desses autores, possuímos parâmetros claros em relação ao estudo da carcinogênese experimental. Isso nos possibilitou conhecer um pouco melhor o conjunto de alterações que levam uma célula normal a assumir características neoplásicas, além de estabelecer estratégias terapêuticas que inibam tal transformação.

Dentre as estratégias terapêuticas a imunoterapia tem-se tornado comum em diversas pesquisas, pois diversos Estudos imunológicos têm revelado que a progressão da doença tecidual para a forma invasiva do câncer requer células que participam normalmente de processos de cicatrização e outras atividades funcionais para serem desviadas para o local onde se está iniciando a formação de tecido pré-maligno; essas células são “seqüestradas” nesse ambiente “pré-maligno” para atuarem no processo de carcinogênese. (LORO 2003)

Assim, compreende-se que um tumor não é somente um conjunto de células aberrantes, mas é dependente também de vários fatores como o micro ambiente tumoral que abrange células do tecido imunológico e sinais químicos que cruzam uma extensa rede de vasos sanguíneos.

3. Proposição

Avaliação macroscópica das alterações decorrentes da aplicação tópica de DMBA diluído em óleo mineral a 0.5%, confirmando o seu potencial carcinogênico;

Avaliação macroscópica das alterações decorrentes da aplicação subcutânea do Imunomodulador P-MAPA em solução fisiológica bem como sua ação inibidora tumoral

Avaliação histomorfométrica da amostra nos parâmetros de área e tamanho das lesões bucais

4. Materiais e Métodos

Todos os procedimentos laboratoriais do presente estudo serão realizados nas dependências no biotério do laboratório de patologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

4.a. 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*.

4.b. Amostra

Foram utilizados 48 hamsters sírius dourados (*Mesocricetus auratus*), sendo 24 machos e 24 fêmeas com 60 dias e um peso corporal médio de 100 gramas, separados em gaiolas pelo gênero e linhagem, respeitando-se o limite de cinco animais por gaiola. As mesmas foram higienizadas em dias alternados, com trocas dos papéis, lavagem e secagem.



Fig. 01 Hamster Sirius Dourados (*Mesocricetus auratus*)

As gaiolas foram dispostas uma ao lado da outra, apresentando identificação de cada animal com respectivo número e matriz geradora de tal grupo, os animais foram tratados com ração labina da marca purina e água ad libitum. Com a finalidade de evitar possíveis trocas entre os grupos, no início do experimento foi realizada marcação na orelha baseada no sistema australiano de marcação de suínos, utilizando para a confecção dos furos um alicate perfurador de lençol de borracha.

Os animais foram pesados após a marcação em uma balança específica para pesagem de animais. No biotério, o ambiente onde os animais permaneceram era iluminado, obedecendo a um ciclo 12 horas de luz, 12 horas de escuro, apresentando uma temperatura ambiente que variava entre 25° e 30°, sem exposição direta a radiação solar.



Fig. 02 Termômetro e gaiola utilizada para confinamento dos animais

Os animais foram distribuídos em seis grupos, apresentando oito animais em cada grupo e quatro por gaiola, correspondendo a três períodos experimentais no intervalo de 7, 16 e 22 semanas. Na distribuição dos grupos cada grupo tratado com imunomodulador possui um respectivo grupo controle. Sendo os grupos tratados: grupo II, grupo IV e grupo VI e os grupos controles I, III e V. O grupo tratado recebeu DMBA três vezes por semana sendo uma pincelada em cada uma das bolsas e imunomodulador P-Mapa todos os dias em injeção subcutânea, o grupo controle recebeu 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.

4.c. Solução de 7-12-Dimetil Benzatraceno (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 depositado em recipiente plástico âmbar específico e 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 acondicionada 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.



Fig. 03 DMBA 95%

4.d. Aplicação do carcinógeno (DMBA)

Os animais foram contidos mecanicamente com um lençol de borracha, de modo que a cavidade bucal permanecesse aberta e as bolsas intrabucais fossem visualizadas com auxílio de um “afastador” de tecidos, sempre tomando os devidos cuidados com a integridade do animal. A técnica de aplicação foi 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.



Fig. 04 contenção e aplicação do carcinógeno intrabucal

4.e. Imunomodulador P-MAPA

O fármaco foi adquirido junto à organização não governamental Farmabrasilis. Ele vem sendo estudado intensamente desde anos 80 por cientistas brasileiros, chilenos e norte-americanos. O P-MAPA é classificado como um imunomodulador, essa classe de substâncias está representada por uma série de 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 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.



Fig. 05 Imunomodulador P-MAPA e balança de precisão para pesagem do medicamento

P-MAPA – Microscopia Eletrônica de varredura

» cristais

nanocristais

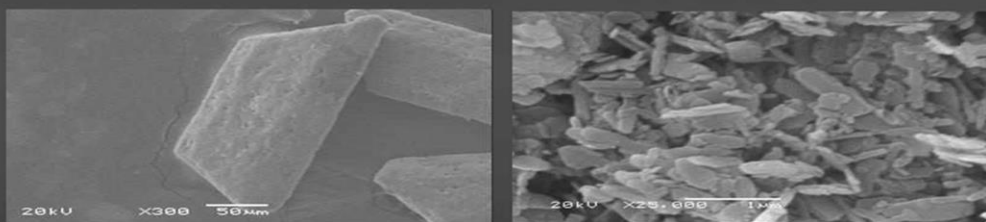


Fig. 06 microscopia eletrônica de varredura do P-MAPA

4.f. 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 foi pesado em uma balança de precisão (ADAM EQUIPAMENT, modelo ADA 210/L) acondicionado em vidros específicos para cada animal em temperatura ambiente, diluído em 2 ml 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.



Fig. 07 Aplicação do Fármaco P-MAPA

4.g. Eutanásia dos animais

Como descrito anteriormente cada grupo amostral foi 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 cloridrato de quetamina a 10% e relaxante muscular, via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada tricotomia da região ventral e necropsia para remoção das bolsas, pulmão, fígado, baço, rins e intestino. Os órgãos retirados foram fixados em formaldeído tamponado a 10% por no mínimo 24 hr e seguiram pelo procedimento laboratorial de rotina.

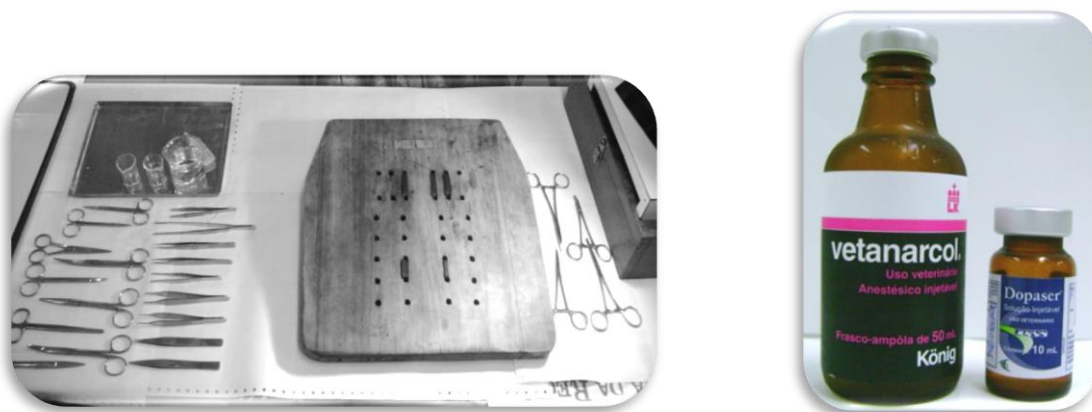


Fig. 08 Mesa preparada para eutanásia dos animais, anestésico e relaxante muscular



Fig. 09 Aplicação do anestésico intraperitoneal e tricotomia na região ventral

4.h. 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.i. Análise Histomorfométrica

A avaliação histopatológica através da imuno-histoquímica, pode servir como base para o diagnóstico e prognóstico na ausência de uma característica morfológica apropriada, sendo um importante auxílio no diagnóstico e prognóstico de diferentes processos patológicos. A análise histomorfométrica é uma análise quantitativa, sendo mais objetiva e precisa. Atualmente existem programas de processamento digital da imagem, que vêm proporcionando inúmeras vantagens como uma melhor qualidade da imagem, maior velocidade, maior precisão, reprodutibilidade e durabilidade de trabalhos que envolvem alguma manipulação de imagens. A histomorfometria analisa de maneira quantitativa os componentes da morfologia tecidual como volume, área, perímetro, etc. Os principais métodos empregados na leitura histomorfométrica são a técnica manual, a semi-automática e a automática. A técnica manual utiliza um retículo integrador de pontos e linhas e uma régua micrométrica acoplados à ocular do microscópio, cujas projeções sobre a estrutura histológica permitem sua quantificação. O método semi-automático utiliza um microscópio conectado a um computador e a uma câmera clara. As imagens das estruturas histológicas são então desenhadas sobre uma placa digitalizadora, com o auxílio de um cursor luminoso que percorre toda a estrutura a ser analisada. A análise quantitativa que se pode empregar depende do tipo de *software* utilizado, o qual poderá permitir também o estudo da microarquitetura do tecido. Esse método semi-automático é preciso, reprodutível e reduz o tempo gasto na leitura histológica, além de possibilitar ao operador a eliminação de artefatos histológicos. A técnica automática emprega computadores acoplados a câmeras de vídeo que analisam e gravam as imagens. Esse método baseia-se na projeção da imagem histológica na tela do computador, onde os diferentes componentes estruturais são quantificados de acordo com os diferentes níveis de coloração. Neste trabalho optou-se pela mensuração da área das lesões quimicamente induzidas na mucosa bucal dos hamsters e a comparação entre os grupos tratados e controles.

Ilustração da Técnica de histomorfometria



Fig. 10 Preparação da peça e confecção das lâminas

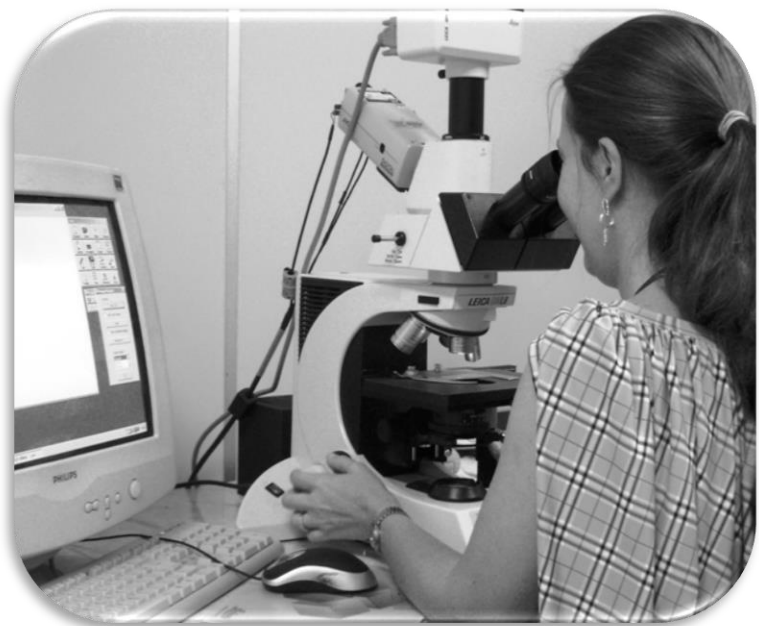


Fig. 11 Análise microscópica, capturação da imagem e estudo histomorfométrico utilizando um programa específico (“*Image-Pro Plus 6*”).

Ilustração da Técnica

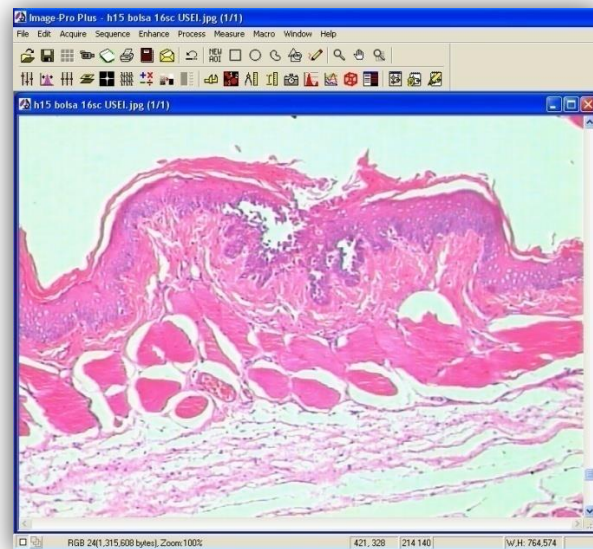


Fig. 12 Primeiro momento da análise, capturação da imagem

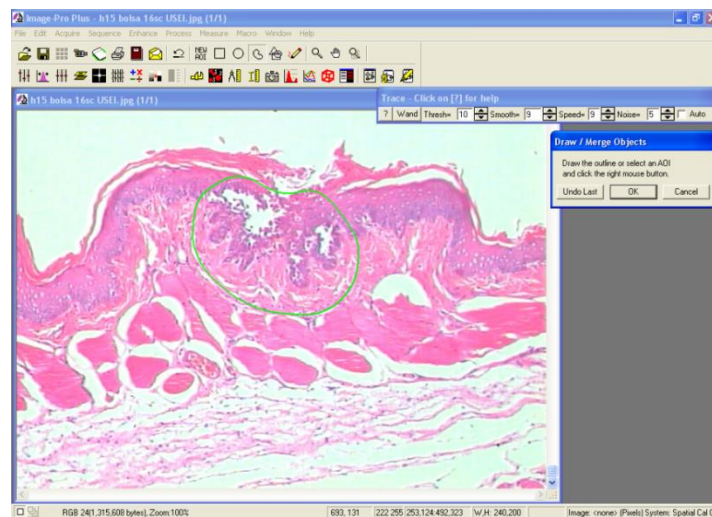


Fig. 13 Segundo momento da análise, delimitação da lesão

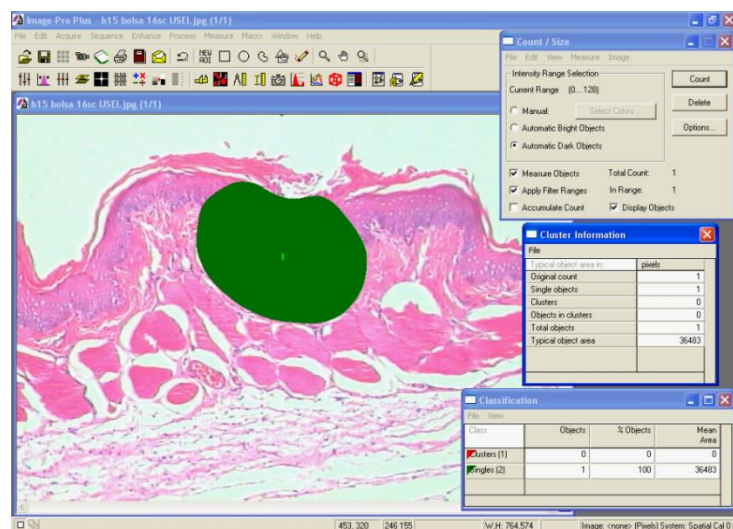


Fig. 14 Terceiro momento da análise, mensuração da área do tumor

5. Resultados

De modo geral, notou-se que os animais que receberam aplicação diária do Imunomodulador P-MAPA apresentaram maior resistência em relação à indução da carcinogênese. Ao relacionarmos a média dos valores em pixels para os grupos controles III e V e tratados IV e VI, pode-se observar um menor tamanho das lesões nos grupos IV e VI. Portanto notou se a capacidade do produto em minimizar in vivo o quadro de debilidade imunológica associado ao processo neoplásico. Alguns animais do grupo V apresentaram se com um quadro de caquexia próximo ao período de 22º semanas de aplicação do DMBA o que não ocorreu com o grupo VI.

Os resultados obtidos na avaliação hismorfométrica indicaram que o imunomodulador P-MAPA apresenta potencialidade contra as lesões neoplásicas bucais.

Gráfico 01.

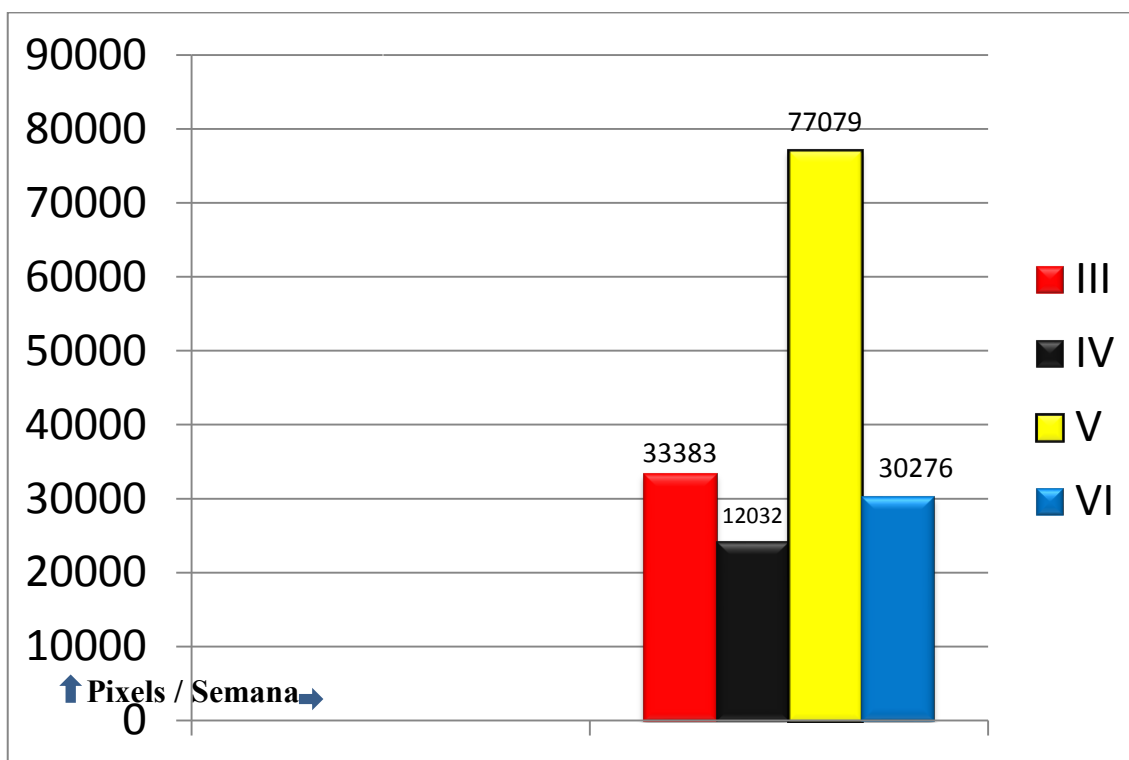


Gráfico 01. Média da mensuração em área das lesões para os grupos III-c, IV-t (16 semanas) V-c e VI-t (22 semanas).

(TABELA DOS VALORES EM ANEXO PAG. 28)

Análise dos resultados

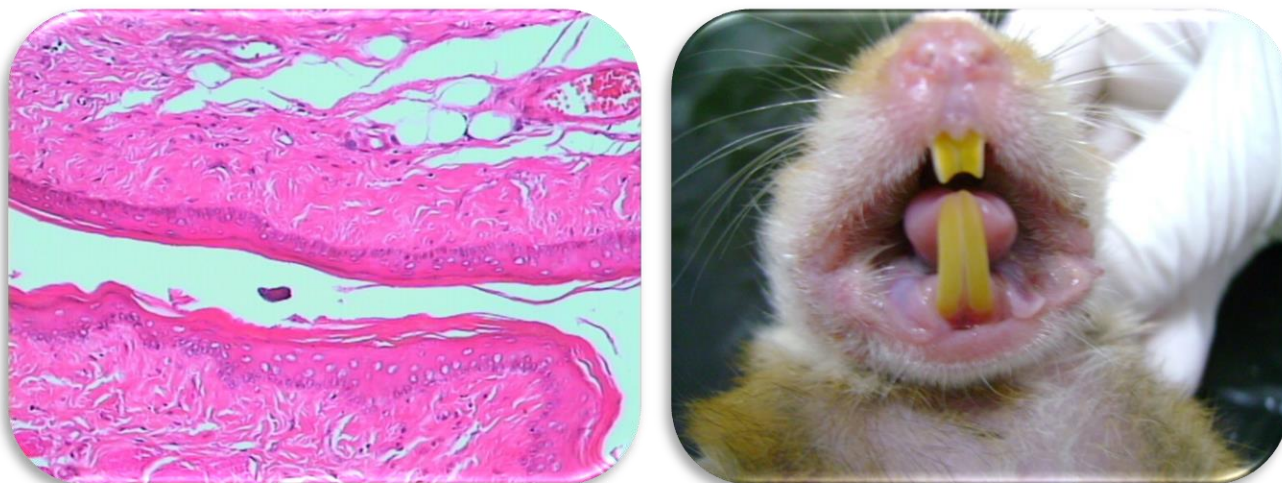


Fig. 15 Aspecto microscópico e clínico 07 semanas. Sem alterações.

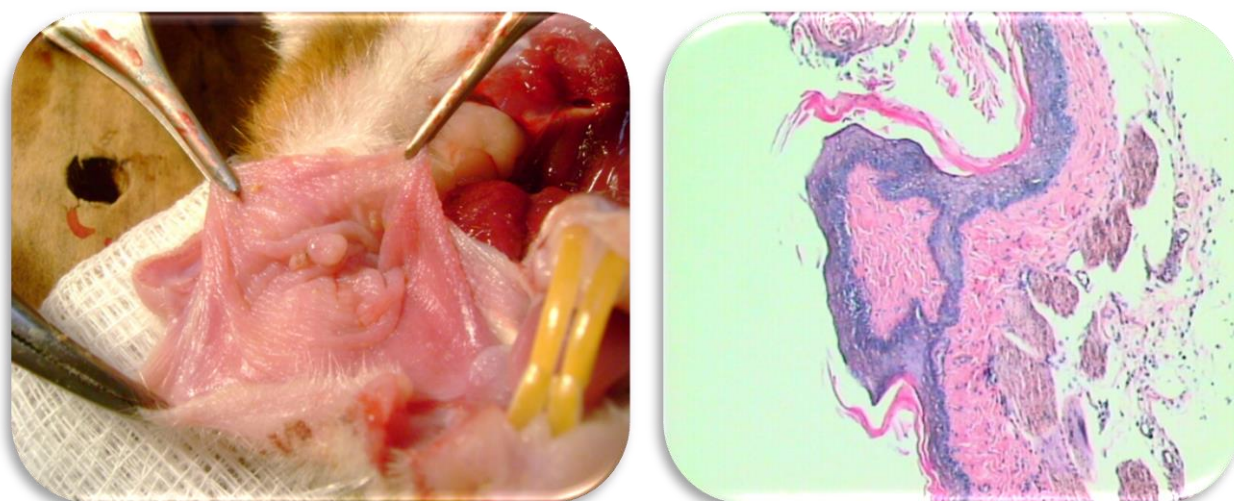


Fig. 16 Aspecto clínico e microscópico do grupo III no período de 16 semanas. Lesão papilomatosa



Fig.17 Aspecto clínico do grupo V controle no período de 16 semanas.

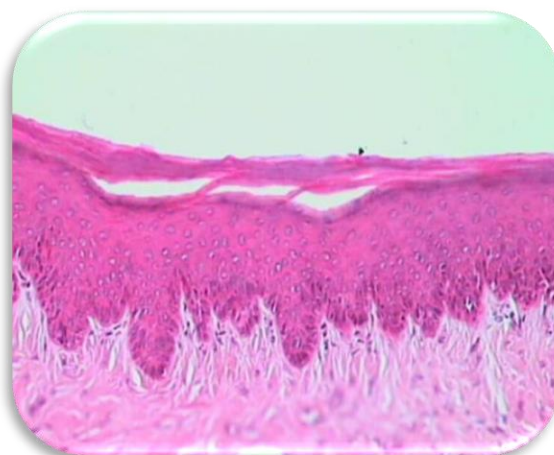


Fig. 18 Aspecto clínico e microscópico do grupo IV tratado no período de 16 semanas. Presença de displasia epitelial.

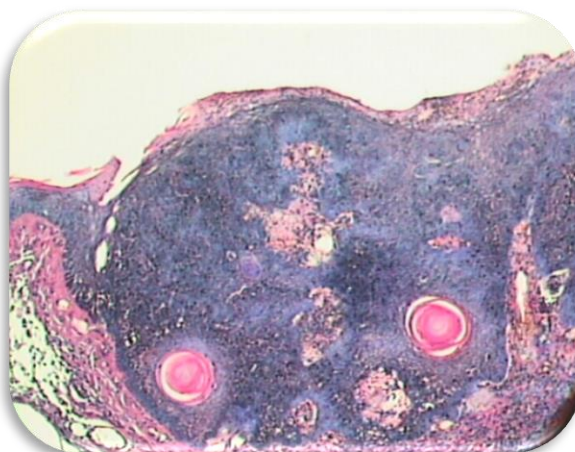


Fig. 19 Aspecto clínico com lesão ulcerada na mucosa bucal e aspecto microscópico com hiper cromatismo, pérolas córneas, falta de adesão celular e padrão invasivo no tecido conjuntivo subjacente grupo V controle no período de 22 semanas.

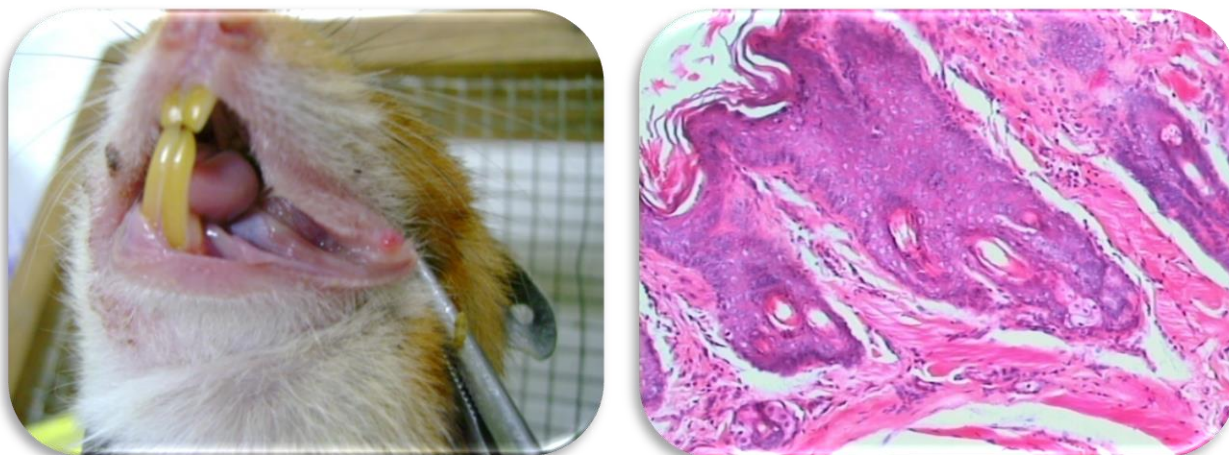


Fig. 20 Aspecto clinico pequeno lesão papilomatosa e aspecto microscópico perda da integridade epitelial grupo VI tratado 22 semanas

6. Discussão

Desde que Salley em 1954 descreveu na literatura a técnica para produção de tumores experimentais DMBA induzidos, este modelo tem sido largamente utilizado para avaliações sobre a patogênese e desenvolvimento tumoral. Logo a utilização em trabalhos científicos que preconizavam ensaios experimentais envolvendo ação quimio e imunopreventiva também passou a ser utilizada.

Como os hamsters são animais de hábitos noturnos, que apresentam condições favoráveis de manuseio, manutenção e apresentam boa adaptação em biotérios, este animal como modelo experimental oferece suporte para inúmeras pesquisas com objetivo de frear o desenvolvimento do câncer.(LORO 2003)

A imunoterapia é a nova ferramenta farmacológica no tratamento dos pacientes com câncer, tendo como objetivo atuar no sistema imune de forma que indivíduo fique com maior resistência aos processos neoplásicos. Pois a ocorrência do câncer não se relaciona com um fator de risco somente ou apenas predisposição genética, mas sim com múltiplos fatores dentre os quais o sistema imune tem fundamental importância(FISBERG, 2007, KOWALSKI, 2007)

A preocupação em produzir medicamentos que atuem na imunologia dos tumores aumentando a sobrevida sem causar efeitos colaterais em pacientes que já se encontram debilitados é uma busca incansável do meio científico. Como já foi descrito anteriormente o imunomodulador P-MAPA apresenta propriedades benéficas no tratamento de neoplasias e acreditamos que este trabalho contribuiu como ponto de partida, neste vasto campo de pesquisa utilizando se dessa substância na inibição do desenvolvimento tumoral, visto que ainda não existem pesquisas dessa natureza para as neoplasias orais.

É importante salientar que obtivemos resultados expressivos em relação aos grupos tratados e controles, principalmente durante o período da 22ª semana em que os grupos controle exibiram quadros de carcinomas invasivos e os tratados apenas quadros de hiperplasia moderada com poucos sinais de atipia observados no estudo histomorfométrico. Porém novas pesquisas necessitam ser realizadas para um melhor entendimento da ação do P-MAPA.

7. Conclusão

Na avaliação histomorfométrica pode-se concluir que a lesão nos grupos controle possui maior área do que as observadas nos grupos tratados.

A instalação do processo neoplásico é notória após o período da 16ª semana de aplicação do DMBA para os grupos controles. Pois no período da 7ª semana não foram constatadas alterações relevantes para ambos os grupos.

O imunomodulador P-MAPA possui propriedades inibidoras para os tumores bucais DMBA induzidos.

Novas pesquisas devem ser realizadas para melhor compreensão da ação do P-MAPA.

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]anthracene-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]anthracene-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-macrosscópica 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.framabrasilis.org.br
11. FASSONI, A. A. Carinogenese 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 scamous 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 anticacinogenic 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. Análize quantitativa das regiões organizadoras nucleolares(NoRs) em carcinomas epidermóides desenvolvdos 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]anthracene-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.

ANEXOS

Tabela

Tabela 01. Mensuração Histomorfométrica Área em Pixels. Período de 16 e 22 semanas.

Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
24979	11239	67873	24761
33625	22195	75942	35568
10541	36496	54398	18561
46786	40224	88542	45487
50987	10986	98641	58756
33383	24228	77079	36626

Média

