



MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NO ESTUDO DO CÂNCER DE BOCA TRATADO COM CICLOFOSFAMIDA

RONALDO FONTES DE PAULA CASTANHO¹; SARA FERREIRA NUNES²;
VINÍCIUS FACCIN BAMP³; LAURA BEATRIZ OLIVEIRA DE OLIVEIRA⁴

¹*Curso de Medicina - Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Pelotas – ronaldfontesp@gmail.com*

²*Curso de Medicina - Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Pelotas – f.saranunes@gmail.com*

³*Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - vfbampi@gmail.com*

⁴*Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia - Universidade Federal de Pelotas – centenooliveira60@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A quimioterapia metronômica, diferente da quimioterapia tradicional, utiliza fármacos em doses menores por um longo período sem intervalo prolongado; este novo método tem como alvo primário as células endoteliais da nova rede vascular tumoral (Browder et al., 2000). Sendo que, o seu mecanismo anti-angiogênico pode ser explicado tanto pela ação direta impedindo o crescimento e estimulando a apoptose das células endoteliais, quanto pela produção indireta de trombospondina-1 (Kerbel; Kamen, 2004). A ciclofosfamida (agente alquilante nitrogenado) é o quimioterápico mais estudado em regimes metrônomos; é administrado via oral, em baixas doses isoladas ou combinada com outros agentes (Penel; Adenis; Bocci, 2011). Desta forma, o tratamento pode ser feito sem internações, apresentando baixo risco de toxicidade e com baixo custo (Andre; Guercio; Pasquier, 2013).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da quimioterapia com ciclofosfamida na angioarquitetura da bolsa jugal após indução química de carcinoma de células escamosas por meio da técnica de corrosão seguida de MEV.

2. METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada sob os paradigmas qualitativos, em uma abordagem descritiva relacional e morfométrica tridimensional respectivamente. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA PUCRS of. 419/10-PG). Doze hamsters sírios dourados (*mesocricetusauratus*) machos tiveram suas bolsas direitas submetidas à indução tumoral com dimetilbenzantraceno (DMBA) e peróxido de carbamida por 55 dias. As bolsas esquerdas não receberam tratamento (bolsas normais - controle). Os animais foram então divididos em dois grupos de seis animais cada; no grupo 1 a bolsa direita foi tratada com ciclofosfamida por 4 semanas, sendo



as dosagens de cada fármaco calculada de acordo com a media aritmética dos pesos dos animais. (grupo tratamento) e no grupo 2 a bolsa direita permaneceu sem tratamento (grupo controle do tratamento). Após 4 semanas, os hamsters tiveram suas redes vasculares perfundidas pela resina Mercox® e analisadas por microscopia eletrônica de varredura. O trabalho foi realizado respeitando os preceitos para minimizar o sofrimento e a dor dos animais, conforme Lei Arouca 2008, nº 11.794/08 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversas alterações foram observadas nas bolsas jugais direitas ao longo das oito semanas de indução do carcinoma de células escamosa. Em contrapartida, na bolsa jugal esquerda não demonstrou nenhuma modificação pois não foram submetidas à indução tumoral.

Análise dos moldes de resina observados sob a MEV

Bolsa jugal esquerda dos diferentes grupos (isentas de tumor): ausência de alterações vasculares morfológicas indicativas de proliferação vascular.

Bolsa jugal direita do grupo 2 (tumores sem tratamento): pôde-se verificar vasos orientados de forma randômica e alterações na morfologia, como variações atípicas no diâmetro e dilatações abruptas, curso alterado de retilíneo para sinuoso, válvulas venosas tornam-se raras, artérias e veias de grande calibre assumiram seu curso individualmente, e coxins intra-arteriais não mais observados.

Bolsa jugal direita do grupo 1 (tumores tratados com ciclofosfamida): o arranjo vascular demonstrou-se semelhante àquelas observadas na bolsa esquerda, apresentando uma malha frouxa sem nenhum padrão distingível. Os vasos arteriais e venosos de grande calibre estavam dispostos em paralelo e com curso retilíneo; os vasos arteriais ramificavam-se de forma regular, respeitando a hierarquia vascular. Observava-se paredes endoteliais lisas, coxins junto aos pontos de bifurcação das artérias, e válvulas posicionadas proximamente a regiões de fusão de dois vasos venosos. O uso de métodos para a aquisição de imagens que possuem alto poder de resolução é de fundamental importância para o estudo morfológico direto dos fenômenos de proliferação vascular. Clauss e Breier (2005) afirmaram que é apenas possível identificar os pilares intussusceptivos e os *sproutings* com equipamentos que tenham um poder de resolução mínimo de 1µm. A escolha da MEV para a análise das réplicas de corrosão tratadas com os fármacos antiangiogênicos foi baseada nesse fato, uma vez que os métodos mais modernos para a obtenção de imagens, como a microtomografia e a ressonância nuclear magnética, ainda não conseguem obter imagens em alta definição. Além disso, a associação das réplicas de corrosão com a MEV permitiu a comparação da geometria do sistema vascular de tumores com e sem tratamento, através da avaliação da característica do curso e das paredes dos vasos, do padrão de ramificações, dos diâmetros vasculares e de distâncias intervasculares. O tratamento das bolsas com o fármaco antiangiogênico provocou uma redução dos sinais de proliferação vascular, além de exibir uma angioarquitetura mais próxima das bolsas livres de tumor, indo ao encontro da teoria de normalização vascular.



formulada por Rakesh K. Jain (2001). A angioarquitetura das bolsas esquerdas dos três grupos foram caracterizadas por sua homogeneidade e regularidade, sendo compatíveis com órgãos em estado fisiológico. As bolsas direitas do grupo controle, em contrapartida, exibiram diversas irregularidades no arranjo tridimensional de suas redes vasculares. Goel *et al.* (2011) e Jain (2013) afirmam que tais alterações estruturais das redes vasculares ocorrem de forma heterogênea durante qualquer momento do crescimento e da progressão dos tumores. Já as bolsas direitas tratadas com ciclofosfamida demonstraram manifestações ainda mais evidentes do processo normalização da angioarquitetura. As réplicas vasculares dessas bolsas possuíam algumas zonas marcadas por uma rede de vasos muito semelhante àquela que supria a túnica muscular das bolsas esquerdas, o que sugeriu o reestabelecimento da rede vascular presente nas bolsas livres de tumor. A rede vascular da camada luminal do grupo tratado com ciclofosfamida exibiu alças e tufo vasculares que apresentavam uma morfologia menos aberrante do que aquela encontrada nas amostras sem tratamento. Dessa forma, evidenciou-se que, em regime metronômico, o tratamento com ciclofosfamida provocou um efeito mais intenso no envelope vascular do que nos tumores exofíticos.

4. CONCLUSÕES

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



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROWDER, T. et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. **Cancer Res**, v. 60, n. 7, p. 1878-86, Apr 1 2000. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766175>>.

KERBEL, R. S.; KAMEN, B. A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 6, p. 423-36, Jun 2004. ISSN 1474-175X (Print)1474-175X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170445>>

PENEL, N.; ADENIS, A.; BOCCI, G. Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: After 10 years of experience, where do we stand and where are we going? **Crit Rev Oncol Hematol**, Jun 2 2011. ISSN 1879-0461 (Electronic)1040-8428 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641231>>.

ANDRE, N.; GUERCIO, B.; PASQUIER, E. Investment in cancer studies in countries of low and middle income. **Lancet**, v. 382, n. 9893, p. 684, Aug 24 2013. ISSN 1474-547X (Electronic)0140-6736 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23972812>>.

CLAUSS, M.; BREIER, G. **Mechanisms of angiogenesis**. Basel: Birkhäuser Verlag, 2005. 1 vol. (XIV-307 -[12] de pl. ISBN 3764364599 rel.

JAIN, R. K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. **Nat Med**, v. 7, n. 9, p. 987-9, Sep 2001. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11533692>.

JAIN, R. K. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 17, p. 2205-18, Jun 10 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic)0732-183X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669226>>.

GOEL, S. et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. **Physiol Rev**, v. 91, n. 3, p. 1071-121, Jul 2011. ISSN 1522-1210 (Electronic)0031-9333 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742796>>.