

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MOLDES DE CORROSÃO VASCULAR – UMA ABORDAGEM TRANSLACIONAL NA PESQUISA DO CÂNCER BUCAL

HAYASHI, Fernanda Yuriane¹; BAMPI, Vinícius F.²; RHEINGANTZ, Maria Gabriela T.³; RECHSTEINER, Sandra. M. E. F.⁴; MINELLO, Luiz Fernando⁵; De OLIVEIRA, Laura Beatriz O.⁶

¹Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Pelotas. fernandahayashi@gmail.com

²Faculdade de Medicina - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

vini_bampi@terra.com.br

^{3,4,5,6}Departamento de Morfologia - Instituto de Biologia - Universidade Federal de Pelotas

mgrheing@yahoo.com.br; sandrafiala@yahoo.com.br; minellof@hotmail.com;

botafogooliveira@uol.com.br

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa translacional visa uma integração mais rápida e eficiente entre as ferramentas inovadoras da ciência básica e os estudos clínicos (GOLDBLATT & LEE, 2010). Nesse sentido, a aplicação de técnicas modernas para a moldagem de vasos sanguíneos associadas a técnicas de aquisição de imagens de alta resolução permite a obtenção de informações qualitativas e quantitativas da angioarquitetura heterogênea dos tumores. Essas informações são importantes não somente para anatomistas, mas também para patologistas e clínicos.

O câncer bucal está entre os seis tipos mais comuns de câncer no mundo, apresentando uma alta taxa de fatalidade (LOSI-GUEMBAROVSKI *et al.*, 2009). A bolsa jugal do hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) é um excelente modelo para estudar as mudanças vasculares que ocorrem na mucosa bucal durante o processo de carcinogênese, devido ao seu fácil acesso anatômico e baixo custo. Além disso, esse modelo apresenta uma relação íntima com os eventos celulares e moleculares que ocorrem no desenvolvimento de neoplasia oral em humanos.

O Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) é uma das principais proteínas envolvidas na angiogênese tumoral (CARMELIET, 2003). O VEGF é apontado como responsável pelas alterações morfológicas na parede vascular, provocando falhas na barreira hematogênica dos vasos e permitindo a metastização do tumor (INAI *et al.*, 2004; WIESER *et al.*, 2005).

A importância central da angiogênese nos tumores tem levado a produção de novas terapias destinadas a interromper esse processo. A droga bevacizumab bloqueia o VEGF, tendo como seus objetivos principais a redução da vascularização e a normalização da trama vascular das neoplasias (KIM *et al.*, 1993).

O presente trabalho visou estudar o efeito da terapia antiangiogênica com um anticorpo anti-VEGF (bevacizumab) na angioarquitetura do carcinoma bucal de células escamosas, quimicamente induzido, em bolsa jugal de hamster sírio dourado, através de moldes de corrosão vascular.

2 METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram executados no laboratório de Habilidades Médicas e Prática Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sendo previamente aprovados e realizados conforme as determinações do comitê de ética da PUCRS (CEUA-PUCRS n. 036/11).

Seis hamsters sírios dourados (*Mesocricetus auratus*), obtidos do biotério da Universidade Federal de Pelotas, foram randomizados em dois grupos de três animais cada. As bolsas jugais direitas de todos os animais foram tratadas com o carcinogênico 1.7.1 9,10 dimetilbenzatraceno (DMBA) (SigmaChemicalCompany®, EUA) diluído a 0,5% em acetona, três vezes por semana, alternadamente com o promotor gel clareador dental peróxido de carbamida a 10% (Opalescences 10%, Ultradent Products®, EUA), duas vezes por semana. A indução tumoral foi executada por 55 dias. As bolsas jugais esquerdas não foram tratadas, sendo consideradas como controle negativo.

Após a indução tumoral, três animais de um grupo foram tratados com bevacizumab (Avastin®, Roche, Suíça - 5 mg/kg i.p.) duas vezes por semana. Os animais do outro grupo não foram tratados e suas bolsas direitas foram consideradas como controle positivo.

Ao final do período experimental, todos os animais foram anestesiados através de um injeção intraperitoneal de cetamina (0,1 mg/g) e xilazina (0,01mg/g) e eutanasiados. Em seguida, as redes vasculares das bolsas jugais foram moldadas com a resina Mercocox® CL-2RB (Ladd Research Industries, EUA), adaptado da técnica de corrosão vascular descrita previamente por (LAMETSCHWANDTNER *et al.*, 1990). Após, os espécimes foram preparados para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O estudo das micrografias eletrônicas foi realizado descritivamente segundo KONERDING (1991), sendo avaliados os seguintes aspectos: padrão de organização da trama vascular, trajeto dos vasos, identificação do tipo de vaso sanguíneo, frequência de ramificações vasculares e figuras de angiogênese.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos moldes vasculares por MEV mostrou alterações na microarquitetura tumoral após o tratamento com bevacizumab. Foi possível observar uma remodelação da vasculatura nos espécimes tratados com a droga anti-angiogênica.

Os vasos dos tumores sem tratamento apresentaram em sua maioria um trajeto tortuoso e com aparência achatada. Por outro lado, as análises dos tumores tratados com bevacizumab evidenciaram uma reparação no trajeto dos vasos, que adquiriram um aspecto próximo ao retilíneo (Fig.1).

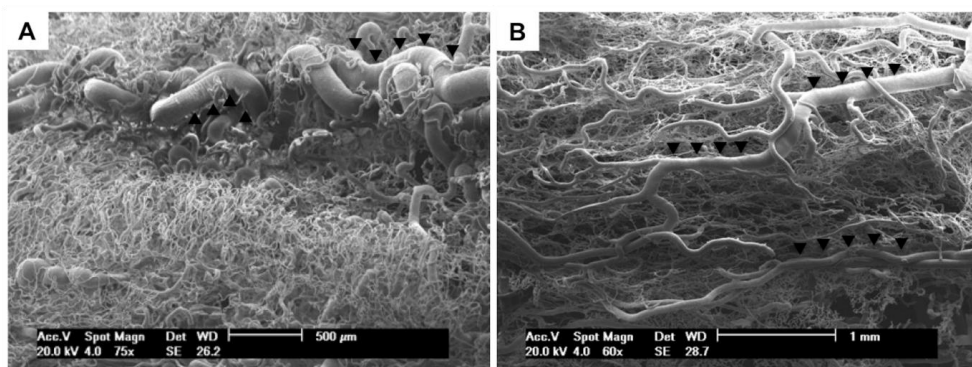


Figura 1. (A) Vasos sanguíneos tortuosos (setas), encontrados nos tumores controle. (B) Vasos sanguíneos mais alongados e menos calibrosos (setas), após o tratamento com bevacizumab.

As bolsas tratadas com bevacizumab apresentaram um padrão de fusão de veias semelhante àquelas encontradas nas bolsas sem tumor, opondo-se àquelas encontradas nos tumores não tratados. A trama capilar observada nos tumores tratados apresentou vasos mais delicados e menos sinuosos, contrastando com os capilares dos tumores não tratados, os quais apresentaram alterações do tipo saculações. Foram também observadas diversas estruturas vasculares com terminações em fundo cego na trama microvascular das bolsas jugais com tumores sem tratamento, o que foi encontrado com menor frequência nos espécimes tratados com bevacizumab (Fig. 2).

O estudo da angioarquitetura dos tumores controles evidenciou variações no calibre dos vasos durante seu curso e extravasamento de resina. Essas alterações foram observadas com menor intensidade nos tumores tratados com bevacizumab (Fig. 2).

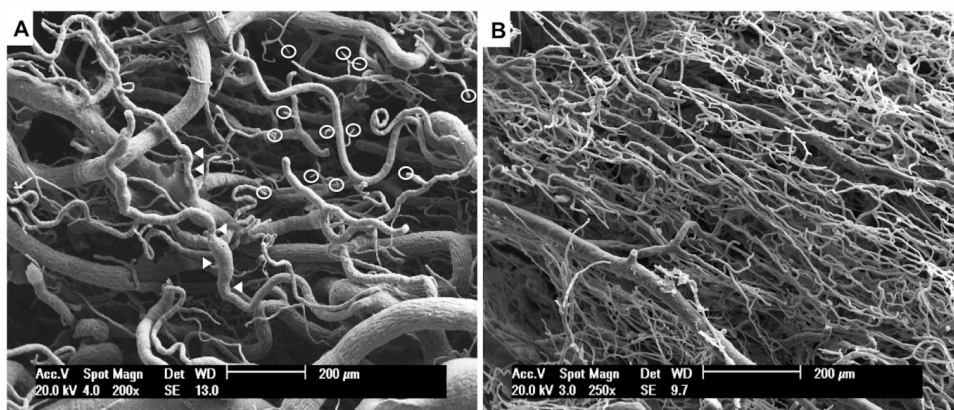


Figura 2. (A) Vasos sanguíneos de tumor controle, apresentando mudança intensa no calibre (setas), grande número de vasos em final cego (círculos) e tortuosidade dos capilares. (B) Rede vascular de um tumor após tratamento com bevacizumab, não apresentando alterações.

Os tumores sem tratamento apresentaram uma rede vascular com uma profusão de microvasos arranjados de forma caótica, contrastada por grandes lacunas. Isso sugeriu que determinadas zonas do tumor não apresentavam aporte sanguíneo.

Os vasos sanguíneos do tumor são desorganizados em sua morfologia, mas altamente aberrantes na sua estrutura e, conseqüentemente, na sua função (WEHLING, 2008; SUNG *et al.*, 2003). Dessa forma, o fluxo de sangue ocorre rapidamente em alguns vasos, enquanto que em outras regiões flui de forma lenta. Esse padrão alterado de fluxo cria um obstáculo para uma entrega uniforme das drogas anti-neoplásicas – um dos grandes entraves para o tratamento dessa patologia (ALBANI & PRAKKEN, 2009; GOLDBLATT & LEE, 2010).

No intuito de normalizar a vascularização dos tumores e, finalmente, melhorar o tratamento do câncer, se faz necessário reparar a estrutura e a função dos vasos, restabelecendo o equilíbrio hemodinâmico nos microambientes do tumor. As terapias anti-angiogênicas, como o bevacizumab, visam diminuir a vascularização e reorganizar a trama vascular das neoplasias (GOLDBLATT & LEE, 2010).

Após o tratamento dos tumores com o anticorpo anti-VEGF, foi possível observar a manutenção do calibre dos vasos sanguíneos ao longo de seus cursos, assim como uma redução da tortuosidade e uma similaridade de suas bifurcações com as dos vasos de bolsas sem tumores.

4 CONCLUSÃO

A análise das eletromiografias evidenciou uma reorganização da rede vascular após o tratamento do carcinoma bucal de células escamosas com o bevacizumab. Tais achados sugerem que essa droga participou no restabelecimento de uma vascularização menos alterada nesse tipo de tumor, o que poderia acarretar uma melhora na entrega de outras drogas usadas concomitantemente no tratamento do câncer.

5 REFERÊNCIAS

- ALBANI, S.; PRAKKEN, B. The advancement of translational medicine-from regional challenges to global solutions. **Nat Med**, v. 15, n. 9, p. 1006-9, 2009.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 653-60, 2003.
- GOLDBLATT, E.M.; LEE, W.H. From bench to bedside: the growing use of translational research in cancer medicine. **Am J Transl Res**, v. 2, n.1, p. 1-18, 2010.
- INAI T, MANCUSO M, HASHIZUME H, BAFFERT F, HASKELL A, BALUK P, HU-LOWE DD, SHALINSKY, D.R.; THURSTON, G.; YANCOPOULOS, G.D.; McDonald, D.M. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. **Am J Pathol**, v. 165, n.1, p. 35-52, 2004.
- KIM, K.J.; LI, B.; WINER, J.; ARMANINI, M.; GILLET, N.; PHILLIPS, H.S.; FERRARA, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 841-4, 1993.
- KONERDING, M.A. Scanning electron microscopy of corrosion casting in medicine. **Scanning Microsc**, v. 5, n. 3, p. 851-65, 1991.
- LAMETSCHWANDTNER, A.; LAMETSCHWANDTNER, U.; WEIGER, T. Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts--technique and applications: updated review. **Scanning Microsc Dec**, v. 4, n. 4, p. 889-940, 1990.
- LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; MENEZES, R.P.; POLISELI, F.; CHAVES, V.N.; KUASNE, H.; LEICHSENBERG, A.; MACIEL, M.E.; GUEMBAROVSKI, A.L.; OLIVEIRA, B.W.; RAMOS, G.; MIZUNO; L.T.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M.; COLUS, I.M. Oral carcinoma epidemiology in Parana State, Southern Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 25, n. 2, p. 393-400, 2009.
- SUNG, N.S.; CROWLEY JR., W.F.; GENEL, M.; SALBER, P.; SANDY, L.; SHERWOOD, L.M.; JOHNSON, S.B.; CATANESE, V.; TILSON, H.; GETZ, K.; LARSON, E.L.; SCHEINBERG, D.; REECE, E.A.; SLAVKIN, H.; DOBS, A.; GREBB, J.; MARTINEZ, R.A.; KORN, A.; RIMOIN, D. Central challenges facing the national clinical research enterprise. **JAMA**, v. 289, n.10, p. 1278-87, 2003.
- WEHLING, M. Translational medicine: science or wishful thinking? **J Transl Med**, v. 6, p. 31, 2008.
- WIESER, E.; STROHMEYER, D.; ROGATSCH, H.; HORNINGER, W.; BARTSCH, G; DEBBAGE, P. Access of tumor-derived macromolecules and cells to the blood: an electron microscopical study of structural barriers in microvessel clusters in highly malignant primary prostate carcinomas. **Prostate**, v. 62, n.2, p.123-32, 2005.