

Descrição da metodologia utilizada no estudo da carcinogênese induzida pelo DMBA em língua de hamster

Angela BOLANHO^a, Elaine Dias do CARMO^b,

Fernando Augusto Cervantes Garcia de SOUSA^c,

Yasmin Rodarte CARVALHO^d, Luiz Eduardo Blumer ROSA^d

^aMestre, Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP

^bDoutoranda, Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP

^cMestrando, Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP

^dDepartamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP

Bolanho A, Carmo ED, Sousa FACG, Carvalho YR, Rosa LEB. Description of a methodology used in the study of DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis. Rev Odontol UNESP. 2005; 34(3): 129-133.

Resumo: 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. Por isso, o objetivo deste trabalho foi descrever a metodologia utilizada para a implantação de um modelo experimental para o estudo da carcinogênese química induzida na língua de hamsters.

Palavras-chave: Câncer bucal; carcinogênese experimental; 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno; hamsters.

Abstract: Cancer represents one of the main causes of death in Brazil and in the world, being the target of several researches. Nowadays, there is a search for understanding the steps whose compose the carcinogenesis process. In this aspect, the studies which try to experimentally reproduce such steps are source of everlasting knowledge with. Thus, the purpose of this study was to describe the methodology employed during the implementation of an experimental model to study chemically-induced tongue carcinogenesis.

Keywords: Mouth neoplasms; experimental carcinogenesis; 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene; hamsters.

Introdução

Nas últimas décadas, o câncer tornou-se a terceira causa de morte mais comum no Brasil. Concomitantemente, o câncer de boca passou a ocupar o sétimo lugar entre as neoplasias malignas de maior incidência. Contudo, a prevenção e o diagnóstico oportuno ainda são as medidas mais eficazes de que dispomos contra essa doença¹². Assim, quanto mais conhecermos a respeito do seu desenvolvimento, mais precocemente poderemos atuar, aumentando consideravelmente a possibilidade de cura.

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 em língua, uma das regiões de maior incidência de câncer bucal em seres humanos. 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.

Ante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo descrever a metodologia empregada para a implantação, em nosso laboratório, do modelo experimental para o estudo da carcinogênese quimicamente induzida pelo 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) em borda de língua de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*).

Material e método

Foram utilizados 72 hamsters sírio dourado (*Mesocricetus auratus*), com peso aproximado de 100 gramas e quatro semanas de vida. Os animais foram mantidos sob condições ambientais de temperatura e ventilação, sendo alimentados com ração comercial e água ad libitum.

Depois de uma semana de adaptação, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo A, com 60 animais, e Grupo B, com 12. A seguir, os animais foram identificados na região subpalmar e/ou subplantar, por meio de injeção subcutânea de aproximadamente 0,02 mL de tinta nanquim preta (Figura 1).

Os animais do Grupo A foram submetidos a três aplicações semanais de uma solução de 0,5% de DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno) em acetona, utilizando-se um pincel de pêlo de marta nº 0 (Figura 2). No Grupo B foi aplicada somente acetona.

Durante a aplicação, os animais foram contidos mecanicamente de modo que a boca permanecesse aberta (Figura 3). A seguir, com o auxílio de uma pinça dente-de-rato, a língua foi tracionada (Figura 4), permitindo que a solução de DMBA ou a acetona fossem aplicadas somente na borda lateral esquerda.



Figura 1. Observar a marcação feita na pata dianteira esquerda do animal com tinta nanquim preta.



Figura 2. Destaque para aplicação do DMBA, pela utilização de um pincel de pêlo de marta nº 0.



Figura 3. Contenção física do animal buscando mantê-lo com a boca aberta durante o procedimento.



Figura 4. Prensão da língua com a pinça “dente-de-rato”.

associado ao relaxante muscular Francotar®. A partir de então, o mesmo procedimento repetiu-se a cada 2 semanas, até que fossem completadas 26 semanas.

Após os sacrifícios, as línguas foram removidas e fixadas em formaldeído tamponado a 10%. Estas foram, então, incluídas em parafina, cortadas em fatias de 5 µm de espessura e coradas pela técnica histoquímica da hematoxilina e eosina. Todo o material obtido foi, a seguir, observado microscopicamente, e os achados histopatológicos foram tabulados segundo critérios de atipia de Bánóczy, Csiba¹ (1976).

Ressalte-se que todos os procedimentos executados foram previamente autorizados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob protocolo nº 024/2000 – PA/CEP de 11 de dezembro de 2000.

Resultado e discussão

Quatro semanas após o início do experimento, todos os animais tratados apresentaram alterações histológicas. Estas incluíam hiperqueratose, retificação dos cones epiteliais e graus variados de atipia. Com o transcorrer do experimento,

foram observadas alterações compatíveis com o diagnóstico de carcinoma epidermóide especialmente depois da 14ª semana (Figura 5).

As alterações clínicas, no entanto, só foram vistas a partir da oitava semana, quando se notou o aparecimento de placas leucoplásicas na mesma região em que foram realizadas as aplicações. Após a 12ª semana, algumas lesões apresentaram-se com aspecto papilomatoso, assumindo, por vezes, dimensões bastante exuberantes (Figuras 6 e 7), além de áreas de ulceração e sangramento ocasional.

Vale frisar que nenhum animal do grupo controle exibiu alterações clínicas ou histológicas, o que, aliado aos achados descritos anteriormente, comprova a eficácia do modelo adotado no estudo da carcinogênese química em mucosa bucal. Todavia, o sucesso de uma metodologia não se limita apenas aos resultados, ou seja, fatores como custo operacional, infra-estrutura necessária e facilidade de execução também merecem ser considerados.

Pensando assim, torna-se importante discutir alguns pontos essenciais à implantação desse modelo em laboratório. Um desses pontos é a escolha do 9,10-dimetil-1,2-benzantra-

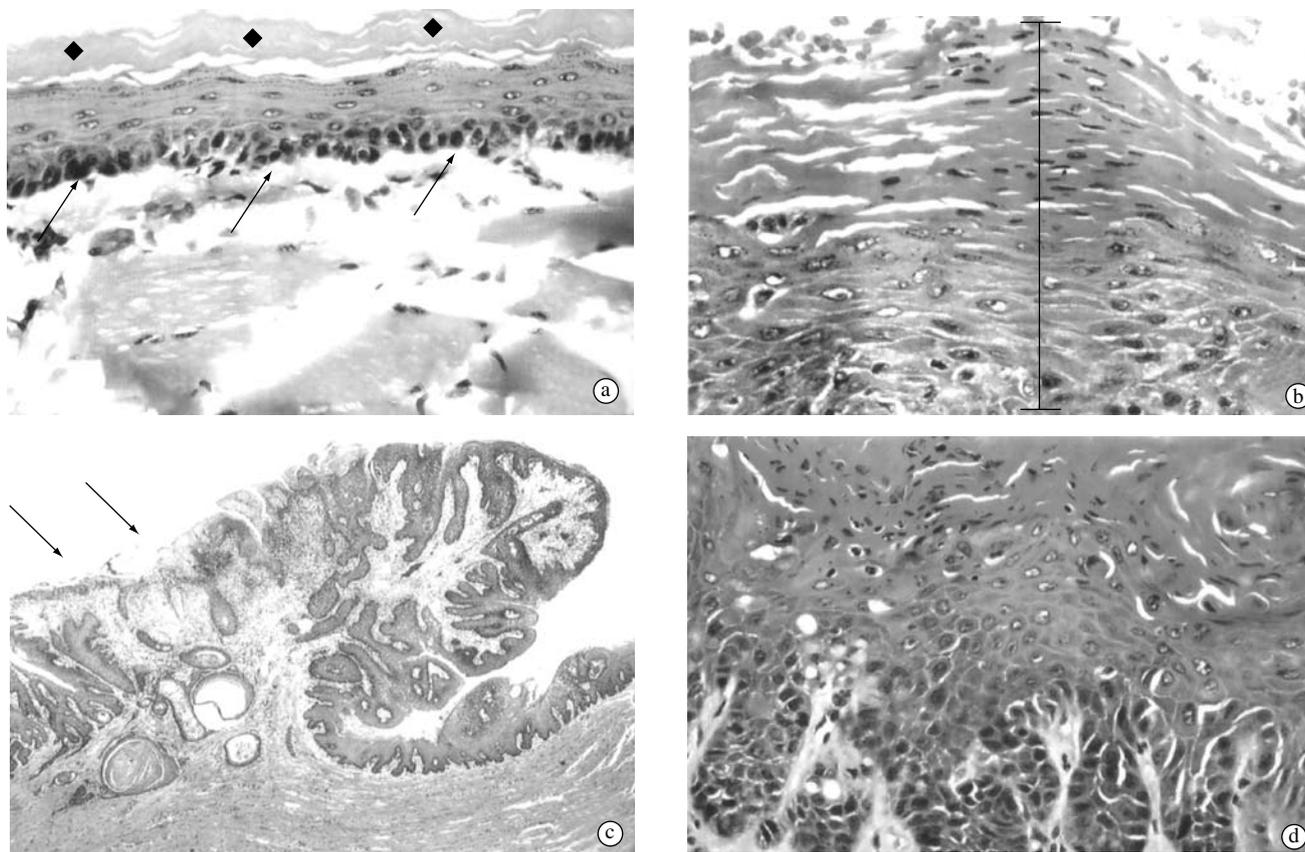


Figura 5. a) Notar a presença de epitélio do tipo pavimentoso estratificado com poucas camadas, camada basal com núcleos bem corados (setas) e superfície com hiperqueratose (♦) (H/E – 200x); b) Destaque de área focal com hiperparaqueratose (barra) (H/E – 400x); c) Vista panorâmica da lesão carcinomatosa com aspecto exóftico (setas) (H/E – 32x); e d) Epitélio de revestimento apresentando células com atípias celulares (H/E – 400x).



Figura 6. Lesões múltiplas de aspecto papilomatoso em borda lingual após 16 semanas de aplicação do DMBA.

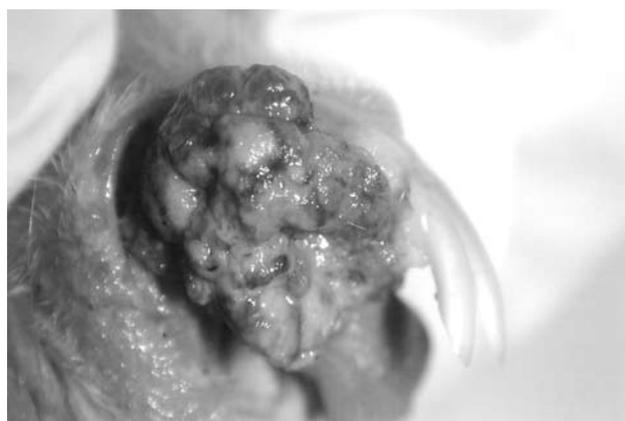


Figura 7. Lesão exofítica exuberante com áreas de necroses após 24 semanas de aplicação do DMBA.

ceno (DMBA) como carcinógeno. Segundo O'Neill¹¹ (1998), o DMBA é um composto químico pertencente à classe dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo descrito na literatura como um carcinógeno completo, pois age tanto na iniciação quanto na promoção. Isso justifica a sua ampla utilização no estudo da carcinogênese química, visto que garante o desenvolvimento de todo o processo sem a necessidade de outras substâncias coadjuvantes.

De acordo com McMillan, Smillie⁹ (1996), o DMBA tem a capacidade de formar ligações covalentes com o nitrogênio e com o oxigênio das bases nitrogenadas do DNA, levando o DNA a sofrer alterações irreversíveis. Estas, quando ocorrem em determinadas localizações, podem fazer com que a célula afetada expresse características de malignidade. É interessante notar, no entanto, que esse potente carcinógeno provém da combustão do carvão e de derivados do petróleo, da queima de plantações agrícolas e da fumaça do tabaco, e que está intimamente relacionado com o câncer bucal².

Embora o DMBA seja empregado no estudo da carcinogênese há décadas, sua alta toxicidade dificulta o seu uso na forma pura, fato que nos levou à utilização de uma solução contendo 0,5% de DMBA diluído em acetona. Esta concentração, conforme afirmou Morris¹⁰ (1961), foi suficiente para induzir o processo de carcinogênese, uma vez que concentrações menores não obtiveram êxito e concentrações maiores resultaram na perda de um grande número de animais. Além disso, o uso da acetona como solvente reduz o tempo necessário para o aparecimento das primeiras alterações histológicas em comparação a outras substâncias como, por exemplo, o benzeno¹⁴.

Quanto à frequência e à forma de administração dessa solução, optamos por aplicá-la três vezes por semana utilizando um pincel de pêlo de marta, pois, segundo a literatura, é a maneira mais prática e eficaz de se levar ao desenvolvimento do carcinoma epidermóide em mucosa bucal quando

da utilização do DMBA. Essa metodologia, porém, acaba por proporcionar uma exposição maior dos operadores ao carcinógeno, o que consiste numa séria desvantagem^{4,7}.

Como acontece em toda pesquisa científica, alguns pontos geram certa polêmica. Neste modelo, os que causam maior discussão estão relacionados ao local de aplicação do carcinógeno e à necessidade ou não de se realizar a escarificação prévia da língua. No que se refere à escolha do local, optamos pela borda lateral da língua, pois, segundo Fujita et al.⁵ (1973), é a localização que apresenta um menor período de latência, além de uma maior correlação com o que ocorre clinicamente em seres humanos. Já quanto à escarificação prévia, decidimos por não realizá-la, uma vez que tal procedimento não reduz o período de latência^{3,8} como se acreditava inicialmente^{5,6,13}.

Vale ainda ressaltar a opção que fizemos pela contenção mecânica dos animais, o que nos proporcionou um considerável ganho de tempo durante a aplicação do DMBA, reduzindo o número de perdas causadas pela sedação. Podemos dizer que essa opção, associada ao modo com o qual identificamos cada animal, constitui uma de nossas principais contribuições para o aprimoramento deste modelo.

Embora exista na literatura alguma controvérsia a respeito desta metodologia, ela representa uma importante fonte de conhecimento sobre o processo de carcinogênese química em boca. Isso se deve à sua possível analogia com o que ocorre nos seres humanos expostos às substâncias carcinogênicas como, por exemplo, aquelas presentes nos subprodutos da combustão do tabaco.

Contudo, este modelo, apesar de simples, requer sistematização e cuidados especiais, principalmente quanto à manipulação do DMBA, fazendo com que medidas de segurança sejam adotadas tanto pelos operadores quanto pelos funcionários do biotério. Além disso, medidas de cunho prático também foram empregadas buscando solucionar

alguns problemas observados durante a execução do projeto piloto. Um deles foi a utilização da contenção mecânica no lugar da sedação prévia, uma vez que a sedação três vezes por semana se mostrou inviável devido ao elevado índice de perda de animais.

Fica claro que muito desse sucesso está relacionado com as contribuições dadas por cada pesquisador ao adaptar modelos já consagrados às suas condições de trabalho. Assim, pequenas variações, como as sugeridas neste artigo, ajudam a viabilizar a implantação desta metodologia, mesmo em centros de pesquisa onde a escassez de recursos impede a adoção de técnicas mais onerosas.

Conclusão

Com base nas observações realizadas, concluímos que:

- Carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA foi obtida na língua de hamster pela sua aplicação três vezes por semana;
- A contenção mecânica dos animais mostrou-se mais favorável que a sedação; e
- A escarificação prévia não reduziu o período de latência.

Referências

1. Bánóczy J, Csiba A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42: 766-74.
2. Bosso RMV, Froes NDT. Origem das mutações. In: Louro ID, Llerena JC, Mela MSV, Ashton-Prolla P, Schwartsmann G, Conforti-Fróes N. *Genética molecular do câncer*. 2ª ed. São Paulo: MSG Produção Editorial; 2002.
3. Fassoni AA, Salles CLF, Consolaro A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1993; 7: 285-91.
4. Fathy LM. Induction of mesenchymal neoplasms by DMBA implantation in deep lingual submucosa of male albino rats. *Egypt Dent J*. 1993; 39: 491-4.
5. Fujita K, Kaku T, Sasaki M, Onoe T. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters: tumor characteristics and site of formation. *J Dent Res*. 1973; 52: 1177-85.
6. Goldhaber P. The role of saliva and other local environmental factors in oral carcinogenesis. *J Am Dent Assoc*. 1957; 54: 517-24.
7. Heller B, Kluffinger AM, Davis NL, Quenville NF. A modified method of carcinogenesis induction in the DMBA hamster cheek pouch model of squamous neoplasia. *Am J Surg*. 1996; 172: 678-80.
8. Marefat P, Shklar G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977; 44: 578-86.
9. McMillan MD, Smillie AC. Scanning electron microscopy of dimethylbenzanthracene (DMBA)-treated hamster cheek pouch. *J Oral Pathol Med*. 1996; 25: 14-9.
10. Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in hamster cheek pouch. *J Dent Res*. 1961; 40:3-15.
11. O'Neill P. *Environmental chemistry*. 3rd ed. New York: Blackie Academic & Professional; 1998.
12. Parise Jr. O. *Câncer de boca. Aspectos básicos e terapêuticos*. São Paulo: Sarvier; 2000.
13. Renstrup G, Smulow JB, Glickman I. Effect of chronic mechanical irritation on chemically induced carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Am Dent Assoc*. 1962; 64: 770-7.
14. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res*. 1954; 33: 253-62