



AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA ANGIOARQUITETURA SUPERFICIAL DE BOLSAS JUGAIS DE HAMSTER SÍRIO COM TUMOR INDUZIDO

GOMES, Ferreira Carolina¹; OLIVEIRA, Laura Beatriz²; BAMPI, Vinícius³; SOUZA, Maria Antonieta Lopes⁴;

¹ Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Pelotas.
carol_ferreira_gomes@hotmail.com

² Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia - Universidade Federal de Pelotas.
botafogooliveira@uol.com.br

³ Faculdade de Medicina – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
vini_bampi@terra.com.br

⁴ Faculdade de Biociências – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
maria.antonietta@pucrs.br

1. INTRODUÇÃO

Os avanços no estudo de imagens estão auxiliando o entendimento da angiogênese tumoral, alvo de diversos estudos por estar relacionada diretamente com o crescimento local dos tumores e sua metastização (Zetter, 1998).

Resinas de baixa viscosidade têm sido utilizadas (Nowell, *et al.*, 1970) para obtenção de réplicas de modelos vasculares, combinadas com a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar o padrão vascular de órgãos normais e patológicos (Lametschwandtner *et al.*, 1990).

A bolsa jugal de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) vem sendo alvo de pesquisas como modelo de indução química de carcinoma oral (Salley, 1954) devido a sua susceptibilidade a diversas influências locais e sistêmicas (Gijare, *et al.*, 1990). A parede da bolsa é similar a pele humana, com a exceção de não apresentar qualquer tipo de anexos (Duling, 1973). Trata-se de um órgão peculiar e único por sua localização subepitelial com fácil acesso e possibilidade de eversão, além de ser uma estrutura bilateral sem comunicação o que proporciona um controle contra lateral em diferentes tipos de experimento.

O hidrocarboneto policíclico aromático 9,10 dimetil-1,2, benzantraceno (DMBA) é o agente carcinogênico mais empregado na produção de neoplasias na bolsa de hamster sírio. O gel clareador dental (promotor) tem como principio ativo o peróxido de hidrogênio, que em contato com a água libera oxigênio na forma de radicais livres, os quais agem diretamente em diversos componentes essenciais das células, podendo ser responsáveis por mutações.

O presente estudo teve como objetivo a análise descritiva (Konerding, 1991) da superfície da microangioarquitetura da bolsa com tumor quimicamente induzido com DMBA diluído a 5% em acetona associado ao gel clareador dental, comparando-a com a bolsa controle. A técnica utilizada para o estudo da microangioarquitetura foi

corrosão associada à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2. MATERIAL E MÉTODOS

A amostra constou de 15 hamsters sírio dourado (*Mesocricetus auratus*), obtidos do estoque da colônia mantida no Biotério da Universidade Federal de Pelotas. Inicialmente com quatro semanas de vida, os animais foram randomizados em três grupos, que receberam tratamento em suas bolsas jugais por um período respectivo de 55, 70 e 90 dias. O DMBA e o clareador dental Opalescence® 10% (peróxido de carbamida a 10%) foram aplicados, respectivamente e alternadamente, três e duas vezes por semana somente na bolsa jugal direita. A bolsa esquerda foi considerada como controle. Nos dias 55, 70 e 90 os animais foram sacrificados e destinados a moldagem vascular com a resina de baixa viscosidade Mercocox®. Após uma semana de polimerização, as bolsas foram dissecadas, corroídas com hidróxido de sódio e preparadas para a técnica de MEV.

Tabela 1 - Esquema da aplicação do mutagênico e do promotor.

Dom.	Seg.	Ter.	Quar.	Quin	Sex.	Sáb.
-	α	B	α	β	α	-

(α) DMBA (β) Gel Clareador dental Opalescence®

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os hamsters sírios utilizados no experimento apresentaram 100% de formação de carcinoma de células escamosas nas bolsas tratadas. Todos os animais sobreviveram à aplicação do mutagênico (DMBA) combinado ao promotor (Opalescence®).

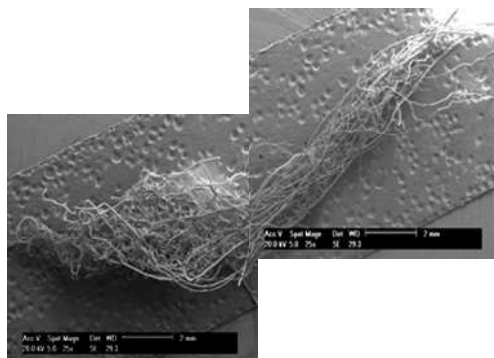


Figura 1 – MEV (25x) da vascularização da bolsa jugal controle com 55 dias.

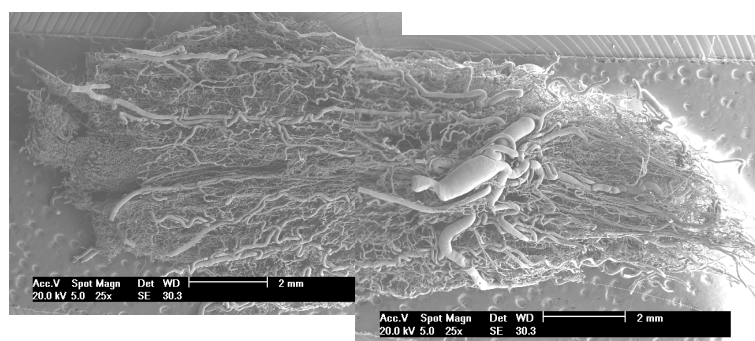


Figura 2 – Réplica da vascularização de tumor quimicamente induzido após 55 dias de indução, examinada em MEV (25x). Aumento da rede vascular.

Análises iniciais da superfície dos espécimes em MEV demonstraram uma pobre vascularização nas bolsas controle quando comparadas com as bolsas com tumor. Estas apresentaram uma rede de vasos que ocupa toda extensão da bolsa, ficando a mesma reduzida. Os vasos das bolsas controle, quando comparados em seu diâmetro, apresentam-se isodiamétricos, considerando todo o trajeto ao longo do órgão.

O rápido crescimento tumoral induziu a formação de uma rede vascular desordenada acarretando um fluxo não convencional. Capilares irregulares e tortuosos de largo diâmetro apresentaram locais de constrição e dilatação, alternadamente, nas bolsas com tumor. As características encontradas nos capilares sugerem que estes sejam fenestrados (Aharinejad & Bök, 1994).

Capilares fenestrados são caracterizados pela presença de orifícios ou fenestras nas paredes das células endoteliais, as quais são obstruídas por um diafragma. São encontrados em tecidos onde acontece intercâmbio rápido de substâncias. Corroborando com a idéia de o tumor realizar amplas trocas de material metabólico.

A análise descritiva dos três diferentes tempos de indução tumoral revelou que os vasos da superfície dos moldes se tornaram cada vez mais tortuosos passando de ondulados na sua forma inicial para espiral no decorrer do tempo de indução.

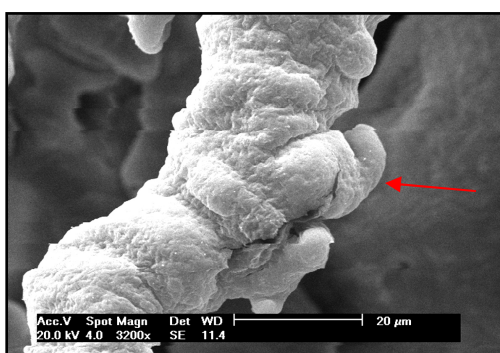


Figura 3 - MEV (3200x) de bolsa jugal com 90 dias de indução. Vaso com dilatações saculares (seta).

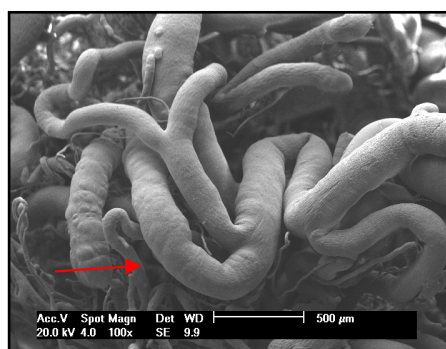


Figura 4 - MEV (100x) de bolsa jugal com 90 dias de indução. Os vasos tornaram-se mais sinuosos (seta).

Estruturas de angiogênese como *basketlike*, *fingerlike* e *corkscrewlike* foram visíveis aos 55 dias de indução tumoral. Estas foram observadas com maior evidência no primeiro grupo do que nos tumores desenvolvido em 70 e 90 dias.

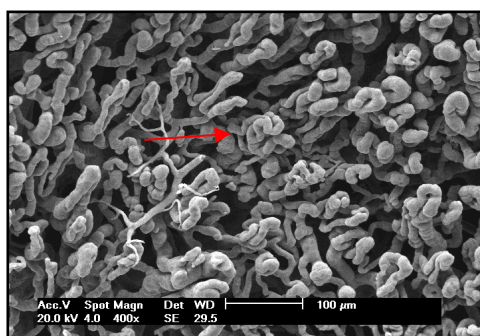


Figura 5 – MEV (400x) de bolsa jugal com 55 dias de indução. Formação de estruturas

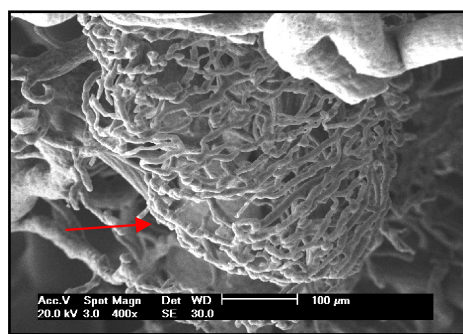


Figura 6 – MEV (400x) de bolsa jugal com 55 dias de indução. Ocorreu a formação de de

angiogênicas *fingerlike* (seta).

estruturas angiogênicas *basketlike* (seta).

Arteriolas, capilares e vênulas normais são identificados por suas estruturas murais impressas nos moldes vasculares e por sua localização, seguindo uma hierarquia (Könnerding *et al.*, 1998). Contudo, essa hierarquia seqüencial não foi encontrada na rede vascular tumoral.

A falta de uma hierarquia vascular adequada juntamente com as outras alterações vasculares aqui mencionadas, além de favorecer o desenvolvimento do tumor e sua metastização, dificulta a entrega de fármacos como, por exemplo, quimioterápicos na região dos tumores.

Uma vez que as células endoteliais dos vasos alterados do tumor apresentam-se modificadas deve-se levar em conta que a normalização destes vasos acarretaria uma melhor entrega dos medicamentos às células tumorais (Jain *et al.*, 2009).

4. CONCLUSÕES

A técnica de MEV associada à corrosão empregada no presente estudo foi adequada para a reprodução e visualização da rede vascular superficial da bolsa jugal controle e com tumor induzido.

A bolsa jugal controle apresentou vasos retilíneos, isodiamétricos e que acompanharam o maior eixo da mesma. A neovascularização promovida pelo crescimento tumoral ocupou todo o volume da bolsa, apresentando em sua superfície vasos tortuosos sem padrão definido entre artérias e veias. Observou-se também a presença de estruturas de angiogênese.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARINEJAD, S., BÖCK, P. Identification of fenestrated capillary segments in microvascular corrosion casts of the rat exocrine pancreas. **Scanning**, 1994, v. 16(4), p. 209-214.
- DULING, B. R. The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of microcirculation. **Microvascular Research**, 1973, v. 5, n. 3, p. 423-429.
- GIJARE, P.S., RAO, K.V., BHIDE, S.V. Inhibitory effects of snuff extract on ornithine decarboxylase and aryl hydrocarbon hydroxylase activities in relation to cell proliferation of mouse tongue epithelial cells. **Indian J. Exp. Biol.**, 1990, v. 28, p.1012–1016.
- JAIN, R. K, DUDA, D. G., WILLETT, C. G., SAHANI, D.V., ZHU, A. X., LOEFFLER, J. S., BATCHELOR, T.T., SORENSEN, A. G. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. **Nat Rev Clin Oncol.**, 2009, v. 6(6), p. 327-38.
- KONERDING, M. A. Scanning electron microscopy of corrosion casting in medicine. **Scanning Microsc.**, 1991, v. 5(3), p. 851-65.
- KONERDING, M. A., FAIT, E., DIMITROPOULOU, C., MALKUSCH, W., FERRI, C., GIAVAZZI, R. Impact of fibroblast growth factor-2 on tumor microvascular architecture: a tridimensional morphometric study. **Am J Pathol.**, 1998, v. 152(6), p. 1607-1616.
- LAMETTSCHWANDTNER, A., LAMETTSCHWANDTNER, U., WEIGER, T. Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts-technique and applications: updated review. **Scanning Microscopy**, 1990, v. 4, n. 4, p. 889-941.
- NOWELL, J. A., PANGBO, R. N., J., TYLER, W. S. Scanning electron microscopy of

the avian lung. **Scanning Electron Microsc**, 1970, p. 249–256.

SALLEY, J. J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. **J Dent Res**. 1954, v. 33(2), p. 253-262.

ZETTER, B. R. Angiogenesis and tumor metastasis. **Annual review of medicine**, Palo Alto Ca Annual Reviews, 1998, v. 49, p. 407-24.