

# VASCULARIZAÇÃO E GRAU DE ATIPIA EPITELIAL EM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSTICAS QUIMICAMENTE INDUZIDAS

## VASCULARIZATION AND EPITHELIAL DYSPLASIA IN CHEMICALLY INDUCED PRENEOPLASTIC LESIONS

Ana Paula Pereira Masa<sup>1</sup>, Mara Luana Batista Severo<sup>2</sup>, Elaine Dias do Carmo<sup>3</sup>, Andresa Costa Pereira<sup>4</sup> e Luiz Eduardo Blumer Rosa<sup>5</sup>

### Resumo

**Introdução:** A angiogênese é um importante fator nos processos neoplásicos, entretanto, seu papel no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ainda é fonte de estudos. **Objetivo:** Avaliar a relação entre o número de espaços vasculares e o grau de atipia epitelial em lesões pré-neoplásicas induzidas na pele de camundongos *hairless*. **Métodos:** Foram utilizados 34 animais, sendo vinte do grupo de estudo (grupo A) e quatorze do grupo controle (grupo B). No grupo A foi pincelado DMBA a 0,5% no dorso dos animais durante 12 semanas (grupo A1; n=10) e 24 semanas (grupo A2; n=10). O grupo controle recebeu a aplicação de acetona por 12 (B1; n=7) e 24 semanas (B2; n=7), e ao final dos períodos, realizou-se a biópsia da pele para análise histopatológica. Nas lâminas histológicas foram avaliadas a atipia epitelial e o número dos espaços vasculares. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey (5%). **Resultados:** A análise revelou que 80% do grupo A1 e 100% do A2 apresentaram gradação intensa de atipia celular e aumento no número de vasos neoformados, quando comparados ao grupo B. **Conclusão:** No modelo estudado, a vascularização foi relacionada ao grau de atipia epitelial nas lesões pré-neoplásicas.

**Palavras-chave:** Angiogênese patológica. Gradação neoplásica. 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno.

### Abstract

**Introduction:** The angiogenesis is an important factor in neoplastic process; however, its role in preneoplastic lesions is still in investigation. **Objective:** to evaluate if there is a relationship between the number of vascular spaces and the degree of epithelial atypia in preneoplastic lesions induced by DMBA in hairless mice skin. **Methods:** Thirty-four animals were divided into an experimental group (group A=20 mice) and control group (group B= 14 mice). The group A animals received 0.5% DMBA in the skin during 12 weeks (group A1; n=10) and 24 weeks (group A2; n=10). The control group received the acetone application during 12 (B1; n=7) and 24 weeks (B2; n=7). At the end of these periods, the skin lesion was biopsied for histopathology analysis. The histological slides were evaluated according to the epithelial atypia and the number of vascular spaces. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test ( $p<0.05$ ). **Results:** We found that 80% of A1 group and 100% of A2 had severe epithelial atypia and high number of vascular spaces when compared to the group B. **Conclusion:** In the methodology used in this study, the vascularization seems to be related to the degree of epithelial atypia in preneoplastic lesions.

**Keywords:** pathologic angiogenesis. neoplastic grading. 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene.

## Introdução

Atualmente, o processo de carcinogênese química em animais é um dos principais meios para o estudo sequencial da evolução do câncer, sendo um modelo confiável para o desenvolvimento multifásico de neoplasias malignas<sup>1,3</sup>.

O modelo experimental baseado na indução da carcinogênese em pele de camundongos com o 9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) ocasiona um dano irreversível no DNA<sup>4</sup>. Estudos prévios relatam que neste modelo experimental, inicialmente há a proliferação epidérmica e hiperplasia, enquanto que, posteriormente, apresentam atipia, distúrbios na estratificação e polarização das células epiteliais, seguidas por um largo número de neoplasias epidérmicas no período entre 10 a 20 semanas, após o início do tratamento com DMBA<sup>5</sup>. Assim, os carcinomas produzidos pelos agentes químicos neste modelo experimental são

semelhantes às lesões neoplásicas de pele em humanos<sup>6</sup> e, dessa maneira, os resultados obtidos apresentam grande relevância para um entendimento mais profundo da carcinogênese epitelial humana<sup>7</sup>.

O modelo experimental em pele de camundongos é um sistema ideal, não apenas para o estudo quantitativo, mas também qualitativo das alterações que ocorrem durante os diferentes estágios da carcinogênese<sup>3</sup> e possibilita a verificação de mudanças teciduais precoces, marcadores diagnósticos e potencial de reversibilidade das lesões<sup>8</sup>, proporcionando não apenas o estudo da biologia neoplásica, como também o desenvolvimento e a avaliação de estratégias de prevenção do câncer<sup>9</sup>.

Para que ocorra o crescimento, a progressão e a metástase do câncer, a angiogênese é um processo fundamental<sup>10-12</sup>, pois por meio da proliferação vascular são obtidos fatores para a manutenção do processo neoplásico, evitando-se assim a necrose celular<sup>11</sup>.

<sup>1</sup> Graduanda do Curso de Medicina. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

<sup>2</sup> Graduanda do Curso de Odontologia. Universidade Federal de Campina Grande - UFCG.

<sup>3</sup> Doutora. Professora do Curso de Odontologia. Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU.

<sup>4</sup> Doutora. Professora do Curso de Odontologia. Universidade Federal de Campina Grande - UFCG.

<sup>5</sup> Doutor. Professora do Curso de Odontologia. Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Contato: Andresa Costa Pereira. E-mail: andresa@cstr.ufcg.edu.br

Desta maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar a relação entre o número de espaços vasculares e a gradação de atipia epitelial presente nas lesões induzidas pelo DMBA em pele de camundongos *hairless*, buscando investigar se a proliferação vascular pode ser usada como um fator para detecção precoce do desenvolvimento da neoplasia neste modelo experimental.

## Métodos

Foram utilizados 34 camundongos *hairless* (HRS/J - Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) de ambos os sexos, com idade média de cinco semanas e peso em torno de 25g. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo de nº 034/2002-PA/CEP UNESP-SJC. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo A (experimental) e grupo B (controle).

No grupo A foi realizada a indução da carcinogênese na pele da região de crista ilíaca no dorso dos animais, por meio da aplicação tópica de DMBA a 0,5% diluído em acetona. Cada aplicação constituiu de três pinceladas da solução com pincel nº 0. Na primeira semana do experimento, foram realizadas duas aplicações e nas semanas posteriores apenas uma. O grupo A foi subdividido, sendo que no grupo A1 (n=10) a aplicação foi realizada durante 12 semanas e no A2 (n=10) durante 24 semanas. No grupo B foi feita aplicação de acetona (com a mesma metodologia da aplicação de DMBA no grupo A) durante 12 semanas no grupo B1 (n=7) e durante 24 semanas no grupo B2 (n=7).

Na 12<sup>a</sup> (grupos A1 e B1) e 24<sup>a</sup> semanas do experimento (grupos A2 e B2), os animais foram anestesiados, as lesões clinicamente detectáveis foram removidas e, posteriormente, os animais foram sacrificados com uma dose excessiva da solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun®) e cloridrato de cetamina (Dopalen®).

As lesões foram fixadas em formaldeído a 10%, durante 48 horas, e posteriormente processadas e incluídas em blocos de parafina. Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação da gradação de atipia epitelial e pelo ácido periódico com reativo Schiff (PAS) para a análise quantitativa do número de espaços vasculares.

A avaliação da gradação de atipia epitelial, realizada por três observadores calibrados e independentemente, baseou-se nos critérios propostos por Bánoczi e Csiba<sup>13</sup> pleomorfismo celular e nuclear, perda da estratificação epitelial, hiper cromatismo nuclear, aumento do tamanho do núcleo, nucléolos aumentados, duplicação da camada basal, queratinização individual ou grupo de células na camada espinhosa ou camadas mais profundas, projeção em gota dos cones epiteliais, figuras mitóticas na porção mediana do epitélio, mitoses atípicas, aumento de figuras mitóticas, perda de coesão celular e perda da polaridade das células basais. De acordo com o número de critérios de atipia epitelial encontrados, a gradação foi classificada em: a) leve: até dois critérios; b) moderada: de três a quatro critérios; c) intensa: cinco ou mais critérios de atipia epitelial presentes.

As lâminas coradas em PAS foram fotografadas e digitalizadas para a análise quantitativa dos espaços vasculares, sendo contados por meio do programa *Image J*®. Utilizou-se um retículo composto por 100

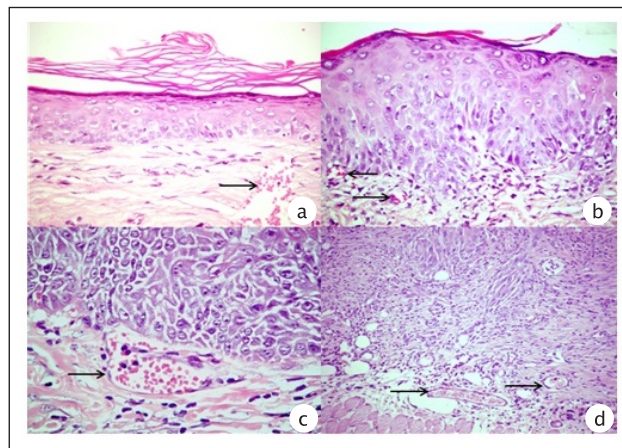
pontos, sendo que os espaços vasculares foram contados quando sobrepujam os pontos de intersecção entre as linhas transversais e as longitudinais. Foram realizadas duas mensurações por lâmina e as médias dos dados obtidos foram tabuladas e submetidos à análise estatística pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5%).

Posteriormente, foi analisada a correlação entre o número dos espaços vasculares e o grau de atipia epitelial nas lesões biopsiadas da pele dos camundongos *hairless*, utilizando-se a correlação de Pearson.

## Resultados

A avaliação macroscópica mostrou que os animais do grupo controle não apresentaram alterações visíveis. Os animais do grupo A1 apresentaram lesões de aspecto nodular, ulcerado, superfície verrucosa, localizadas na região de crista ilíaca, local de aplicação do DMBA. Os animais do grupo A2 apresentaram múltiplas lesões espalhadas pelo dorso com aspecto nodular, de grande extensão e superfície verrucosa.

De acordo com os critérios propostos por Bánoczi e Csiba<sup>13</sup> a análise microscópica dos cortes revelou que os casos do grupo controle (n=14) não apresentaram atipias epiteliais (Figura 1a), enquanto no grupo experimental A1, foi observado um caso (10%) de atipia leve, um caso (10%) de atipia moderada (Figura 1b) e oito (80%) casos de atipia intensa (Figura 1c) e no grupo A2, os 10 casos (100%) apresentaram atipia intensa (Figura 1d). A média de atipias epiteliais e o desvio-padrão dos grupos A1 e A2 foram  $5,47 \pm 2,4$  e  $11,06 \pm 0,52$ , respectivamente.



**Figura 1** - Aspectos histológicos das lâminas coradas em HE. **1a)** Grupo B1: não apresenta atipia epitelial; vaso sanguíneo congestionado (seta) (400x); **1b)** Grupo A1: atipia moderada; vasos sanguíneos congestionados (setas) (400x); **1c)** Grupo A1: atipia intensa; células neoplásicas adjacentes a vaso sanguíneo (seta) (400x); **1d)** Grupo A2: atipia intensa vasos sanguíneos congestionados (setas) (200x).

Com relação à análise dos espaços vasculares, a média do número de vasos sanguíneos foi maior no grupo experimental A ( $18,88 \pm 5,78$ ) quando comparada a do grupo controle B ( $7,54 \pm 2,86$ ). Os valores referentes aos subgrupos A1, A2, B1 e B2 estão expostos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Número de espaços vasculares (média  $\pm$  desvio - padrão) referente ao grupo experimental (A) e controle (B), após o período de 12 (A1 e B1) e 24 semanas (A2 e B2) de indução da carcinogênese.

Grupo experimental (A)		Grupo controle (B)	
A1 (n=10)	A2 (n=10)	B1 (n=7)	B2 (n=7)
18,60 $\pm$ 5,96	19,15 $\pm$ 5,9	7,29 $\pm$ 3,59	7,79 $\pm$ 2,18

\*n: número de animais.

A análise estatística do número de espaços vasculares em relação aos grupos controle e experimental foi dada pelo teste ANOVA e Tukey (5%). Pôde-se notar diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ( $p=0,000$ ), resultado não encontrado em relação ao período de aplicação (12 e 24 semanas).

Para finalizar, foi avaliada a correlação de Pearson entre o grau de atipia epitelial e o número de espaços vasculares no grupo experimental (A1 e A2), entretanto este valor foi baixo ( $r=0,216$ ) e sem significância estatística ( $p=0,36$ ).

## Discussão

No presente estudo observou-se alterações celulares na 12ª semana do processo de carcinogênese, com casos de atipia leve, moderada e intensa, seguindo as evidências do trabalho de Carmo<sup>14</sup>, que utilizou a mesma metodologia.

É importante notar que o intervalo entre os períodos experimentais (12 e 24 semanas) pode ter sido muito pequeno, fato que justifica a ausência de diferença tanto do grau de atipia epitelial, quanto do número de espaços vasculares, não apenas no grupo controle (B1 e B2), mas também no experimental (A1 e A2). Por esse motivo, a correlação de Pearson no grupo experimental não apresentou significância estatística.

## Referências

- DiGiovanni J. *Multistage skin carcinogenesis in mice*. In: Waalkes MP, Ward JM. *Carcinogenesis*. New York: Raven Press, 1994; 54(1): 265-300.
- Stenbäck F, Mäkinen MJ, Jussila T, Kauppila S, Risteli J, Talve L *et al*. The extracellular matrix in skin tumor development-a morphological study. *J Cutan Pathol*, 1999; 26(7): 327-38.
- Zoumpourlis V, Solakidi S, Papatoma A, Papaevangeliou D. Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2003; 24(7): 1159-65.
- Rhiemeier V, Breitenbach U, Richter KH, Gebhardt C, Vogt I, Hartenstein B *et al*. A novel aspartic proteinase-like gene expressed in stratified epithelia and squamous cell carcinoma of the skin. *Amer Jour Pathol*, 2006; 168(4): 1354-64.
- Mäkinen M, Stenbäck F. Skin tumor development and keratin expression in different experimental models. Relation to inducing agent and target tissue structure. *Exp Toxic Pathol*, 1998; 50(3): 199-208.
- Aldaz CM, Conti CJ, Klein-Szanto AJ, Slaga TJ. Progressive dysplasia and aneuploidy are hallmarks of mouse skin papillomas: relevance to malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84(7): 2029-32.
- Marks F, Furstenberger G. Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. *Eur J Cancer*, 2000; 36(3): 314-29.
- Devor DE, Henneman JR, Kurata Y, Rehm S, Weghorst CM, Ward JM. *Pathology procedures in laboratory animal carcinogenesis studies*. In: Waalkes MP, Ward JM. *Carcinogenesis*. New York: Raven Press, 1994; 429-466.
- Macejova D, Brtko J. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). *Endocr Regul*, 2001; 35(1): 53-9.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992; 267(16): 10931-34.
- Bolontrade MF, Stern MC, Binder RL, Zenklusen JC, Gimenez-Conti IB, Conti CJ. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis*, 1998; 19(12): 2107-13.
- Conti CJ. Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *The Oncol*, 2002; 7(3): 4-11.

13. Bánoczi 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(6): 766-74.
14. Carmo ED. *Carcinoma epidermoide induzido quimicamente pelo DMBA em pele de camundongos hairless: estudo clinico, histologico e histoquimico*. [Dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004. 129 p.
15. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer*, 2009; 45(11): 1924-34.
16. Stabenow E, Tavares MR, Ab'Saber AM, Parra-Cuentas ER, de Matos LL, Eher EM et al. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma. *Clinics*, 2005; 60(3): 233-40.
17. Laitakari J, Nayha V, Stenback F. Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal tumour development. *J Clin Pathol*, 2004; 57: 394-401.