**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ELOISA MARCHI DOS ANJOS SORIA

**Efeito da suplementação de glutamina no câncer bucal
DMBA-induzido em hamsters**

**BAURU
2012**

ELOISA MARCHI DOS ANJOS SORIA

**Efeito da suplementação de glutamina no câncer bucal
DMBA-induzido em hamsters**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Versão corrigida

BAURU

2012

So68e Soria, Eloisa Marchi dos Anjos
Efeito da suplementação de glutamina no câncer
bucal DMBA-induzido em hamsters/ Eloisa Marchi dos
Anjos Soria. – Bauru, 2012.
79 p.: il.; 30 cm

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Luis Antônio de Assis
Taveira.

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível
no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de
Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética FOB-USP
Protocolo nº: 01/2011
Data: 11/04/2011

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Ladi**, e ao meu pai, **Roberto**.

Meus primeiros e insuperáveis mestres.

AGRADECIMENTOS

A todos que foram mestres na minha vida e que me fizeram mestre.

Ao meu **marido**, por todo amor e doação. Por realizar meus sonhos, todos os dias.

À minha **família** pela segurança e conforto, pelo apoio e aceitação das minhas escolhas. Pela sinceridade, pelos momentos de filosofia, de medo e de alegria. Simplesmente, por tê-los por perto.

Ao meu **orientador**, pela amizade, pelos ensinamentos e pela capacidade de desconstrair qualquer situação. Admirável.

A todos os **professores** que encontrei ao longo da jornada dentro da USP. Aos mais próximos e paternos e, também, aos mais distantes. Guardo uma lembrança e um aprendizado de cada um. Aos que voltaram a fazer parte dessa história depois de alguns anos, ou que, na realidade, nunca saíram dela.

Aos meus **amigos**. Aos que torceram de longe, aos que socorreram no desespero, aos que alimentaram ratos, aos que manipularam amostras, aos que revelaram resultados, e aos que jogaram conversa fora e tomaram café comigo.

Aos **funcionários da USP** que me acolheram no primeiro dia e me acompanharam durante toda essa estadia na FOB.

Muito obrigada.

"Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar."

William Shakespeare

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de cavidade bucal tem alta prevalência e índice de mortalidade considerável entre as principais neoplasias malignas. Acredita-se que carcinógenos químicos promovem a carcinogênese através de danos oxidativos e mutações genéticas, entre outros mecanismos. O organismo evita o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou seja, o estresse oxidativo, através da produção endógena de antioxidantes como o α -tocoferol, o retinol e a glutathione. Diversos estudos têm demonstrado que a administração de glutamina pode aumentar a produção de glutathione, proteger células de danos oxidativos e alterações genéticas, e, assim, inibir ou retardar a carcinogênese. Esse aminoácido é considerado um agente quimiopreventivo por atuar em alvos moleculares e celulares específicos, no processo de inflamação ou transdução de sinais, além de induzir atividade de enzimas de detoxificação e suprimir proliferação celular. O protocolo de indução de carcinogênese bucal induzida por DMBA, dimetilbenzantraceno diluído em acetona, aplicado três vezes por semana, foi bem estabelecido em hamsters e sabe-se que a formação de EROs durante sua metabolização pode se difundir a partir do local de geração, para fora da célula, e iniciar a cadeia de peroxidação lipídica. Sabe-se que existe metabolização hepática do DMBA quando aplicado em mucosa jugal. Nesse estudo avaliou-se o efeito da suplementação de glutamina via oral e intragástrica em carcinogênese DMBA-induzida em mucosa de bolsa jugal de hamsters. Dosaram-se níveis de malondialdeído (MDA), principal produto de peroxidação lipídica, e antioxidantes α -tocoferol, retinol e glutathione. Obteve-se como resultado a formação de carcinoma de células escamosas na maioria dos animais, independentemente da administração de glutamina, na dosagem testada. Não foram observadas diferenças na quantidade de MDA, glutathione, proteína e retinol no fígado dos animais. Tampouco houve diferença entre os níveis plasmáticos de glutathione entre os grupos. Esses resultados demonstram que não houve estresse oxidativo significativo nos tecidos testados. Porém houve acúmulo de α -tocoferol no fígado dos animais tratados com o carcinógeno por 15 semanas, independentemente da administração de glutamina. Conclui-se, portanto, que pode ter ocorrido agressão ao tecido hepático desses animais e que a glutamina não foi eficiente na prevenção de carcinogênese ou agressão hepática. Possivelmente o tecido tumoral apresentaria alteração do equilíbrio oxidante/antioxidante, mas não foi avaliado nesse estudo.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Glutamina. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Effect of glutamine supplementation in oral cavity DMBA induced cancer in hamsters

Oral cavity squamous cell carcinoma has a high prevalence and substantial mortality rate among the major malignancies. It is believed that chemical carcinogens promote carcinogenesis by oxidative damage and mutation, among other mechanisms. The body prevents the accumulation of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress, through the production of endogenous antioxidants such as α -tocopherol, retinol, and glutathione. Several studies have demonstrated that glutamine administration can increase the production of glutathione, protecting cells from oxidative damage and genetic changes, and thus inhibit or delay the carcinogenesis. This amino acid is considered a chemopreventive agent to act on specific molecular and cellular targets, in inflammation or signal transduction, and activity to induce detoxification enzymes and suppress cell proliferation. The dimethylbenzanthracene (DMBA) induced carcinogenesis protocol consists in three times a week application of DMBA diluted in acetone, in hamsters. It is known that the formation of ROS during its metabolism can diffuse from the site of generation, outside the cell, and initiate the lipid peroxidation chain. It is known that there is hepatic metabolism of DMBA when applied to the buccal mucosa. This study evaluated the effect of oral and intragastric glutamine supplementation in DMBA-induced carcinogenesis on the cheek pouch mucosa of hamsters. Levels were assayed for malondialdehyde (MDA), the main product of lipid peroxidation, and the antioxidants α -tocopherol, retinol and glutathione. The results show the formation of squamous cell carcinoma in most animals, regardless of this glutamine amount administration. There were no differences in the amount of MDA, glutathione, protein and retinol in the liver of animals. There was no difference between plasma levels of glutathione between groups. These results demonstrate that there was no significant oxidative stress in the tissues tested. However, there was accumulation of α -tocopherol in the liver of animals treated with the carcinogen for 15 weeks, regardless of the administration of glutamine. Therefore that may have occurred aggression liver tissue of animals and that glutamine was not effective in the prevention of carcinogenesis or liver injury. Possibly the tumor tissue present shift in the balance oxidant / antioxidant, but it was not evaluated in this study.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Glutamine. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Formação de EROs, lipoperoxidação e proteção antioxidante.....	27
Figura 2 -	Contenção mecânica do animal e aplicação tópica com pincel.....	45
Figura 3 -	Contenção mecânica do animal e aplicação intragástrica com agulha.....	45
Figura 4 -	Mucosa normal de bolsa jugal com epitélio escamoso estratificado ortoqueratinizado, 2 a 4 camadas de células, tecido conjuntivo denso camada muscular de fibras estriadas e mais profundamente tecido conjuntivo frouxo (H.E., 50X).....	55
Figura 5 -	Mucosa de bolsa jugal com epitélio escamoso estratificado hiperplásico e hiperortoqueratinizado, com displasia intensa, hiper Cromatismo, pleomorfismo, perda de polaridade celular, diversas figuras de mitose. Subjacente, tecido conjuntivo denso (H.E., 200X).....	55
Figura 6 -	Mucosa de bolsa jugal apresentando formação papilomatosa, com epitélio escamoso estratificado hiperplásico e hiperortoqueratinizado, com displasia intensa. Subjacente, tecido conjuntivo fibroso denso com infiltrado inflamatório (H.E., 25X).....	57
Figura 7 -	Em maior aumento, observa-se displasia intensa, hiper Cromatismo, hiper Cromatismo, pleomorfismo, disqueratose, pérolas de queratina no conjuntivo. Subjacente, tecido conjuntivo fibroso denso com infiltrado inflamatório (H.E., 100X).....	57
Figura 8 -	Em maior aumento, o epitélio displásico, observam-se figuras de mitose atípicas, hiper Cromatismo, pleomorfismo, disqueratose e pérolas de queratina (H.E., 400X).....	59

Figura 9 -	Carcinoma de células escamosas. Epitélio escamoso estratificado com hiperplasia e hiperqueratose, acantose, células displásicas, núcleos hipercromados e pérolas de queratina. No conjuntivo, observaram-se ilhas e cordões de células tumorais, além de infiltrado inflamatório moderado (H.E., 25X).....	59
Figura 10 -	Em maior aumento, epitélio displásico, observam-se figuras de mitose atípicas, hipercromatismo e pleomorfismo (H.E., 400X).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Alterações histopatológicas em epitélio de mucosa de bolsa jugal.....	54
Tabela 2 -	Ganho de peso ao final do experimento.....	61
Tabela 3 -	Valores de MDA, proteína e GSH no fígado.....	61
Tabela 4 -	Valores de Retinol e α -Tocoferol no fígado.....	62
Tabela 5 -	Valores de GSH em soro.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Aminoácido de cadeia ramificada
ATP	Adenosina trifosfato
DMBA	Dimetilbenzantraceno
ERNs	Espécies reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione reduzida
GST	Glutathione transferase
H.E.	Hematoxilina e eosina
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MDA	Malondialdeído
TMP	Tetrametionipropano
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
O_2^-	Superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$OH^\cdot$	Radical hidroxil
NO	Óxido nítrico
$LOOH$	Hidroperóxido lipídico
L	Radical lipídico
Na^+	Sódio
K^+	Potássio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
3	PROPOSIÇÃO	37
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
5	RESULTADOS.....	51
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de morte no Brasil e no mundo. Dentre as neoplasias malignas, o carcinoma de células escamosas de cavidade bucal tem alta prevalência e índice de mortalidade considerável. Acredita-se que carcinógenos químicos promovem a carcinogênese através de danos oxidativos e mutações genéticas, entre outros mecanismos.

Danos oxidativos às células são mais prevalentes em situações de estresse oxidativo, quando há um acúmulo de oxidantes em desequilíbrio com os antioxidantes. Carcinógenos causam maior produção metabólica de oxidantes, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enquanto o organismo combate esse estresse com sistemas antioxidantes, endógenos ou exógenos. Vitamina E e A são alguns dos principais mecanismos antioxidantes exógenos, enquanto que a glutathione é um importante antioxidante produzido endogenamente.

Diversos estudos têm demonstrado que a administração de glutamina pode aumentar a produção de glutathione, proteger células de danos oxidativos e alterações genéticas, e, assim, inibir ou retardar a carcinogênese de determinados tipos celulares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer lidera a causa de morte em países economicamente desenvolvidos e é a segunda maior causa em países em desenvolvimento. O crescimento e envelhecimento da população, além do estilo de vida, propiciam o aparecimento da doença. Estima-se que ocorreram cerca de 12.7 milhões de novos casos e 7.6 milhões de mortes por câncer no mundo em 2008, sendo 56% dos casos e 64% das mortes em países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2011).

Estima-se que 263.900 de casos novos e 128.000 mortes por câncer de cavidade bucal aconteceram em 2008, no mundo (JEMAL et al., 2011).

No Brasil, a mortalidade por esse tipo de câncer alcançou 6.510 casos, sendo 5.135 em homens e 1.394 em mulheres, em 2009 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010). Um aumento considerável é projetado para 2012 quando ocorrerão 14.170 novos casos de cavidade bucal, sendo 9.990 em homens e 4.180 em mulheres, no ano de 2012 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011).

A etiologia destas neoplasias malignas tem sido fortemente associada a carcinógenos ambientais como: fumo, tabaco sem fumaça, e infecção por HPV sinergicamente com álcool e fumo, são principais fatores de risco para câncer de cavidade bucal. O tabagismo é responsável por 42% das mortes por câncer de cavidade bucal e consumo de álcool por 16%. Em países de alta renda essa porcentagem é 70 e 30% respectivamente (JEMAL et al., 2011).

Estima-se que a associação do uso de tabaco e consumo de álcool é responsável por cerca de 75% da ocorrência dos casos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. O mecanismo carcinogênico desses agentes químicos não está completamente elucidado, porém foi sugerido o envolvimento de danos oxidativos e alterações genéticas (LIM et al., 2009). Sabe-se que o cigarro contém aproximadamente 60 agentes carcinógenos e é uma das principais fontes de carcinogênese mediada por oxidantes ambientais, enquanto que o álcool facilita a produção de oxidantes endogenamente (ZIECH et al., 2010).

Por tratar-se de uma doença de difícil tratamento, sua prevenção é fundamental. Quimioprevenção pode ser definida como o uso de compostos sintéticos ou naturais para intervir precocemente em estágios pré-cancerosos, inibindo, retardando ou revertendo a carcinogênese. Os agentes quimiopreventivos

devem atuar em alvos moleculares e celulares específicos, como no processo de inflamação ou transdução de sinais (BELTRÃO-BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2006). É reconhecida como a abordagem mais promissora para prevenir, inibir ou reverter o processo de carcinogênese, eles podem exercer seu papel induzindo atividade de enzimas de detoxificação ou suprimindo proliferação celular (ARUNA; SIVARAMAKRISHNAN, 1990).

As células do nosso organismo encontram-se expostas, cronicamente, a fontes oxidantes, endógenas e exógenas, e são equipadas com um sistema de defesa antioxidante. Quimicamente, a oxidação e a redução estão definidas como: a primeira, como perda de elétrons, e a segunda, como ganho de elétrons. O potencial de oxirredução, ou potencial redox, mede o fluxo de elétrons no par redox. Nos seres aeróbios, as múltiplas reações químicas com o oxigênio representam o mecanismo mais eficiente de produção de energia, podendo gerar compostos intermediários ou substâncias reagentes do oxigênio, que aceitam elétrons e se constituem nos radicais livres, formados principalmente na mitocôndria. Os radicais livres são compostos altamente instáveis e reativos, com um ou mais elétrons não pareados, em geral na rotação inversa, na última camada orbital (SANTOS, 2006).

Espécies reativas de oxigênio – EROs – são produtos do metabolismo celular normal e desempenham papel fundamental na estimulação da sinalização de vias em resposta a mudanças do ambiente intra e extra celular. A maioria dos EROs é gerada pela cadeia respiratória mitocondrial. Nas reações metabólicas, células aeróbicas produzem EROs como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($OH^\bullet$), e peróxidos orgânicos como produto normal de reações de redução de oxigênio molecular. A transferência de elétron para o oxigênio molecular ocorre na cadeia respiratória, localizada na membrana mitocondrial. Sob condição de hipóxia, a cadeia respiratória mitocondrial também produz óxido nítrico (NO), que pode gerar espécies reativas de nitrogênio (ERNs). ERNs podem gerar outras espécies reativas, por induzir grande quantidade de peroxidação lipídica (REUTER et al., 2010).

O radical $OH^\bullet$ desempenha importante papel na lipoperoxidação por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular. É considerado o principal iniciador de tal processo (BARBOSA et al., 2010). Esse radical é altamente reativo, responsável por diversas alterações genéticas,

incluindo ruptura dos filamentos de DNA, modificação das bases de DNA, anormalidades cromossômicas, e transformação celular (WEI, 1992).

Fisiologicamente, os oxidantes são neutralizados por antioxidantes. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz (BARBOSA et al., 2010).

Existe um complexo sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase) e não-enzimático (glutathione, vitamina C e E), endógeno e exógeno, para a proteção do organismo contra oxidantes (SIES, 1991).

Existem diferentes mecanismos de ação de antioxidantes: impedir a formação dos radicais livres ou espécies não-reativas (sistemas de prevenção), impedir a ação dos radicais (sistemas varredores) ou, ainda, favorecer o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo foi definido como um distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor do primeiro. Corresponde ao desequilíbrio entre a produção de várias espécies reativas e a habilidade natural, protetora, do organismo de lidar com estes compostos reativos e prevenir seus efeitos adversos (SIES, 1991). O estresse oxidativo tem sido envolvido na etiologia de doenças crônicas relacionadas com o envelhecimento em geral e também com o câncer.

O desenvolvimento do câncer está definido em diferentes estádios: iniciação, promoção e progressão. O estresse oxidativo interage com esses três estádios; na iniciação EROs podem causar dano ao DNA, por introduzir mutações genéticas e estruturais; na promoção EROs podem contribuir com expressão genética alterada, EROs podem causar alterações nas bases do DNA, rupturas dos filamentos, danos ao genes supressores de tumor, e aumento da expressão de proto-oncogenes, bloqueio de comunicação entre células, resultando em aumento da proliferação celular, ou diminuição de apoptose em população de células iniciadas; na progressão o estresse oxidativo pode adicionar mais alterações no DNA de população de células iniciadas, alterações estas, que podem ocorrer durante a proliferação celular, em função da presença de metabólitos gerados pela alta produção de energia intracelular. Estes metabólitos devem ser tamponados para prevenir dano oxidativo e morte celular (REUTER et al., 2010).

O DNA não é a única molécula celular alterada pela agressão dos radicais livres. Os tipos primários de oxidantes (oxigênio reativos e as espécies nitrogenadas), se não controlados, podem causar danos aos ácidos nucleicos, às proteínas ou às membranas lipídicas. Atingindo os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, provocam a peroxidação lipídica (DAS et al., 2007; SANTOS, 2006). Os ácidos graxos não-saturados exercem um papel crucial na integridade das membranas celulares e suas alterações podem afetar a atividade de enzimas envolvidas, por exemplo ativação/detoxificação de carcinógenos. Foi demonstrada correlação positiva entre exposição a toxinas ambientais e biomarcadores de danos celulares mediados por EROs, o que evidencia a relação entre carcinógenos e carcinogênese (ZIECH et al., 2010). Estas e outras considerações sugerem que a oxidação é de grande importância na carcinogênese humana (FANG; SEKI; MAEDA, 2009; SANTOS, 2009).

A formação de EROs durante a metabolização do DMBA pode se difundir a partir do local de geração, para fora da célula, e iniciar a cadeia de peroxidação lipídica (ARULKUMARAN et al., 2007). Um importante biomarcador é o malondialdeído (MDA), o principal produto de peroxidação lipídica. Sugere-se que o MDA tem efeito mutagênico e carcinogênico, sendo a principal molécula na formação de aduções de DNA (ZIECH et al., 2010).

Recentemente, evidências consideráveis demonstraram que EROs estão envolvidos na ligação entre inflamação e câncer. Uma importante característica de promotores de tumor é sua habilidade de recrutar células inflamatórias e estimulá-las a gerar EROs. A inflamação crônica tem sido envolvida em diversas etapas da carcinogênese, incluindo transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase. As células inflamatórias produzem mediadores solúveis, como metabólitos de ácido araquidônico, citocinas e quimiocinas, que atuam recrutando mais células inflamatórias para o local da agressão. Mastócitos e leucócitos recrutados aumentam o consumo de oxigênio e consequentemente aumentam a produção e liberação de EROs. E esses mediadores podem ativar a sinalização da cascata de transdução de sinais, bem como induzir alterações em fatores de transcrição que medeiam a resposta ao estresse. O estado inflamatório/oxidativo mantido pode gerar danos às células e ao estroma. Por longo período de tempo, pode levar a carcinogênese (REUTER et al., 2010; SANTOS, 2006).

Células inflamatórias podem aumentar o dano ao DNA ativando procarcinógenos a danificar DNA, por exemplo, neutrófilos podem ativar aminas aromáticas, aflotoxinas, estrógenos, fenóis e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por mecanismos dependentes de EROs. E ainda, tem sido demonstrado que ambos, neutrófilos e macrófagos, liberam grandes quantidades de superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil após ativação por metabolismo redox (REUTER et al., 2010).

Uma das características essenciais das células tumorais é sua habilidade aumentada de sobreviver em relação a células normais. EROs podem induzir senescência e morte celular e portanto, tem funções antitumorais. As EROs promovem a sobrevivência ou morte da célula tumoral, dependendo do tipo de célula envolvida, da localização de produção da ERO e da sua concentração (REUTER et al., 2010).

Os antioxidantes neutralizam as EROs, interferem em procarcinógenos, previnem ligação de carcinógenos ao DNA, inibem aberração de cromossomos, contem replicação de células transformadas, suprimem promotores do câncer, e podem induzir regressão de lesões bucais pré-cancerígenas (DAS et al., 2007).

A glutathione (GSH) é o maior antioxidante endógeno, produzido pelas células (REUTER et al., 2010). A sua biossíntese ocorre dentro das células, exceto em células epiteliais, pela ação consecutiva de duas enzimas. Na primeira reação, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos ácido glutâmico e cisteína, catalisada pela enzima gama-glutamylcisteína sintetase, levando à gama-L-glutamyl-L-cisteína. Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutathione sintetase. Estas etapas requerem ATP e Mg^{+2} (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

É conhecido que a GSH pode proteger o DNA contra danos causados por EROs. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra EROs e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

O núcleo do resíduo cisteyl-glicina da GSH está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando a GSSG (glutathione oxidada). A GSSG é, então, reduzida pela glutathione

redutase, regenerando o GSH, num processo à custa de NADPH. A GSH é sintetizada pelo fígado ou absorvida da dieta, no intestino delgado e transportada para a circulação (KRETZSCHMAR, 1996).

A proteção de GSH contra a peroxidação lipídica pode ocorrer por três reações. Primeira, a GSH é usada como substrato pela glutathione peroxidase, na eliminação de peróxidos. Segunda, a GSH reduz a forma oxidada da vitamina C, que assim pode atuar, mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional. Finalmente, a GSH pode, através da glutathione-S-transferase, detoxificar aldeídos reativos que são gerados durante a peroxidação lipídica. Se, de fato, grande parte da ação da GSH é obtida pela indução de suas enzimas, é necessária a manutenção do nível de GSH para suportar a ação funcional destas enzimas (JONES et al., 1995).

Algumas vias da formação de EROs, o processo de lipoperoxidação e a participação da glutathione e outros antioxidantes como a vitamina E e C no equilíbrio do estresse oxidativo estão demonstradas na Figura 1 (VALKO et al., 2007).

O radical ânion superóxido (O_2^-) é formado pela redução do oxigênio molecular (O_2), e transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é eliminado pela enzima glutathione peroxidase (GPX), que utiliza glutathione (GSH) como doador de elétron e a transforma na forma oxidada (GSSG). O radical hidroxil ($OH^\bullet$) abstrai um elétron de um ácido graxo poliinsaturado e forma um radical lipídico ($L^\bullet$), o qual interage com O_2 e forma um radical peroxil lipídico. Esse radical, não reduzido por antioxidantes, inicia o processo de lipoperoxidação. O $L^\bullet$ pode ser reduzido pela forma reduzida da vitamina E, resultando em hidroperóxido lipídico (LOOH) e radical da vitamina E. A vitamina E pode ser reduzida novamente pela vitamina C, gerando o radical da vitamina C, e pela GSH, gerando GSSG. As formas oxidadas serão regeneradas em seguida.

Variações nos níveis de GSH afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA. Sua oxidação ou depleção pode diminuir a síntese proteica. Essa molécula pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (UHLIG; WENDEL, 1992).

GSH é um dos instrumentos mais eficientes que as células podem explorar na detoxicação de drogas e xenobióticos em geral. Ela pode detoxificar carcinógenos diretamente e subsequentemente exportá-los das células (REUTER et al., 2010).

Fonte: Adaptado de Valko et al. (2007)

Figura 1 - Formação de EROs, lipoperoxidação e proteção antioxidante

Os seres vivos estão continuamente expostos a compostos químicos denominados xenobióticos que podem interagir de maneira deletéria ao organismo.

A detoxificação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em três fases distintas, porém estritamente relacionadas: fase I, II e III. Nas fases I e II, geralmente se observa a transformação do xenobiótico em uma espécie que apresenta maior solubilidade em água, além de uma menor toxicidade. A maioria dos processos da fase I é mediada pelas enzimas citocromo P450 que são responsáveis, principalmente, por reações de oxidação dos xenobióticos. As enzimas da fase II catalisam a conjugação dos xenobióticos, ou de seus metabólitos oriundos da fase I, com substratos endógenos, geralmente GSH, ácido glucurônico e glicina, tornando-os mais solúveis em água. Quantitativamente a formação de conjugados com a GSH é a principal reação observada para muitos xenobióticos durante a fase II. Em condições normais, os níveis celulares de GSH são elevados, indicando que o mecanismo de detoxificação *via* GSH pode representar uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência e garantia da perpetuação de muitas espécies. Na fase III, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados. De fato, a fase II do metabolismo de xenobióticos compreende um importante passo para a eliminação destas espécies do meio celular, podendo em alguns casos envolver a participação de transportadores. É o caso, por exemplo, dos transportadores dos conjugados de glutathione/xenobióticos (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

A atuação das glutathione transferases (GSTs) é uma importante estratégia de defesa da célula contra xenobióticos. Uma vez formados, os conjugados da glutathione/xenobióticos são reconhecidos por transportadores específicos e conduzidos para o meio intercelular. No meio intercelular, os conjugados da glutathione/xenobióticos são clivados pela ação das enzimas transpeptidase e dipeptidases presentes na porção externa da membrana celular. Alguns autores referem-se a estas etapas como a fase III do metabolismo de xenobióticos (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

É importante observar que as enzimas GSTs fazem parte de um sistema de defesa integrado, e que a eficiência deste sistema depende da ação combinada de outras enzimas no sentido de fornecer GSH, bem como de transportadores que facilitem a eliminação dos conjugados de GSH (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

A exposição a carcinógenos, tais como o 9,10-dimetil1-1,2-benzatraceno (DMBA) podem induzir atividade de enzimas de fase I e fase II. Enzimas de fase II detoxificam esses agentes aumentando sua solubilidade em água e dissipando compostos eletrofilicos (BALAKRISHNAN; MENON; MANOHARAN, 2008). Por ser um carcinógeno indireto, DMBA passa por ativação metabólica na mucosa de bolsa jugal pela citocromo P450 monooxigenase para formar metabólitos eletrofílicos. Sabe-se que o DMBA é metabolizado no fígado pelo citocromo P450 além da mucosa de bolsa jugal, quando pincelado nessa região (CHANDRA MOHAN et al., 2005).

Derivados do DMBA podem ligar-se covalentemente ao DNA, formando aduções que podem transformar-se malignamente. Os metabólitos são conjugados com GSH pela GST, enzima detoxificadora de fase II para proteção do DNA. Enzimas de fase I geralmente são induzidas concomitantemente. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ativam a transcrição de citocromo P450 e GST (CHANDRA MOHAN et al., 2005).

Foi demonstrado que uma solução de acetona com DMBA é um carcinógeno eficaz para utilização em experimentação com hamster sírio dourado (SALLEY, 1954). O modelo de carcinogênese de mucosa de bolsa jugal em hamster sírio dourado é o melhor sistema para investigação da eficácia de agentes quimiopreventivos na carcinogênese bucal. Esses carcinomas são similares morfolologicamente e histologicamente aos humanos. Além de esses tumores expressarem diversos marcadores bioquímicos e moleculares que são expressos nos humanos (BALASENTHIL et al., 2000; SHKLAR, 1999).

Alguns mecanismos carcinogênicos do DMBA têm sido propostos, entre eles, supressão da função de células imunes, geração de espécies reativas de oxigênio causadoras de depleção de GSH, e alterações genéticas. A metabolização do DMBA ocorre através da geração de espécies reativas de oxigênio, o que eleva a oxidação intracelular. Portanto, a administração de antioxidantes pode retardar esse processo (CAO et al., 2001).

Proto-oncogenes, genes que controlam o crescimento celular, quando ativados são convertidos a oncogenes, que desenvolvem papel importante na carcinogênese. Essa transformação pode ser secundária à exposição a carcinógenos químicos (WEI, 1992).

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido, não carregado, polar, composto por carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%). No organismo, todos os seus tecidos podem sintetizar glutamina, sendo, portanto, considerada um aminoácido não essencial. É o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular e encontrada em concentrações relativamente elevadas em outros diversos tecidos corporais. Essa classificação, entretanto, tem sido questionada, pois em situações críticas, tais como cirurgias, traumas, queimaduras, HIV, câncer e exercícios físicos exaustivos, a síntese de glutamina não supre a demanda exigida pelo organismo e torna-se um aminoácido essencial (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

A depleção da glutamina é atribuída a suas múltiplas funções no organismo, como um metabolito intermediário no suprimento de carbono e nitrogênio para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e proteínas, como combustível para células em divisão e como substrato para a síntese de GSH, o principal antioxidante endógeno (LIM et al., 2009). A proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, o balanço acidobásico, o transporte da amônia entre os tecidos, a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, entre outros, são algumas das funções em que a glutamina está envolvida (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Duas enzimas são responsáveis pela síntese e degradação de glutamina a partir do glutamato, a glutamina sintetase e a glutaminase, respectivamente.

Grande parte da glutamina sintetizada no músculo esquelético, durante o estado pós-absortivo, ocorre por meio da captação de glutamato presente na circulação sanguínea. A outra via de produção de glutamina de forma direta é por meio do catabolismo proteico, que leva à síntese de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), glutamato, aspartato e asparagina, fornecendo esqueletos de carbono para a síntese *de novo* de glutamina. Estudos em ratos demonstram que os ACR são transaminados, quase que exclusivamente, com α -cetoglutarato para formar glutamato, que pode fornecer seu grupo amino para formar piruvato, gerando alanina, ou incorporar amônia livre, dando origem à glutamina. Entretanto, os ACR não são completamente metabolizados, porque a enzima-chave de controle da sua taxa de oxidação, a 2-oxoisovalerato desidrogenase, apresenta-se quase totalmente na forma inativa no músculo esquelético. Consequentemente, no tecido muscular, os

ACR captados inicialmente são utilizados como fornecedores de nitrogênio para a formação de glutamina e alanina (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Mediante a catálise de conversão de glutamato em glutamina e da utilização da amônia como fonte de nitrogênio e com consumo de trifosfato de adenosina (ATP), a glutamina sintetase é a enzima-chave para a síntese da glutamina e para a regulação do metabolismo celular do nitrogênio. A glutamina sintetase é uma aminotransferase amplamente distribuída entre os organismos vivos, sendo sua atividade fundamental para a manutenção da vida de microrganismos e de animais. Os fatores que regulam a atividade da glutamina sintetase são diversos, tais como glicocorticoides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

São atribuídas diferentes funções às ações da glutamina sintetase. No cérebro, é utilizada como um importante agente na redução da concentração de amônia, com consequente desintoxicação e síntese de glutamina para nova síntese de glutamato. No pulmão e no músculo esquelético, é responsável pela manutenção da concentração de glutamina plasmática, sendo essencial em situações patológicas ou de estresse. Nos rins, a glutamina sintetase é imprescindível para o controle do metabolismo do nitrogênio e manutenção do pH no organismo (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

A glutaminase é a enzima que catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio. A hidrólise da glutamina representa o primeiro passo na sua utilização a partir da síntese do glutamato. Outras reações podem ocorrer principalmente na via que permite o consumo de glutamina no ciclo do ácido tricarboxílico. A glutaminase está envolvida em diversos processos metabólicos e pode ser encontrada em bactérias, plantas e animais. Em mamíferos, a forma mais ativa da glutaminase apresenta-se principalmente nas mitocôndrias. Tanto a concentração tecidual quanto a concentração sanguínea de glutamina podem ser influenciadas pela atividade da glutamina sintetase ou da glutaminase (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Alguns tipos de células, tais como células do sistema imune, rins e intestino, apresentam elevada atividade de glutaminase, sendo assim considerados tecidos consumidores de glutamina. Por outro lado, os músculos esqueléticos, os pulmões, o fígado, o cérebro e, possivelmente, o tecido adiposo apresentam elevada atividade

da enzima glutamina sintetase, sendo assim considerados tecidos sintetizadores de glutamina (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Hormônios como a insulina e os fatores de crescimento semelhantes à insulina estimulam o transporte de glutamina para o meio intracelular, ao passo que glicocorticoides estimulam a liberação de glutamina para o meio extracelular. Considerando-se que o gradiente transmembrana através da célula muscular é elevado para a glutamina, sua difusão livre através da membrana celular é restrita (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Dessa forma, a glutamina necessita ser transportada de forma ativa para o interior das células, por meio de um sistema dependente de sódio (Na^+), que resulta em gasto de ATP. Esse transporte promove, concomitantemente, a absorção de água e a liberação de potássio (K^+), fato que aumenta o estado de hidratação e influencia o volume celular (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

O aumento no volume celular pode ser considerado um sinal anabólico, uma vez que altera favoravelmente o *turnover* proteico, promove a síntese proteica e aumenta a disponibilidade de substratos para os diversos sistemas envolvidos no processo de recuperação e reparação tecidual (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Esse aumento volumétrico, contudo, não é o único mecanismo pelo qual a glutamina pode influenciar outros sistemas envolvidos na homeostasia celular, tais como o sistema antioxidante. No meio intracelular, a glutamina pode sofrer hidrólise e elevar a disponibilidade de glutamato, que é essencial para a síntese do principal antioxidante celular, a GSH (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Estudos têm demonstrado que a glutamina pode influenciar uma variedade de funções e vias de sinalização celular. Entre os papéis mais estudados da glutamina estão a modulação da expressão de genes relacionados com a síntese e degradação de proteínas relacionadas com proliferação celular, resposta antiapoptótica, homeostasia e sobrevivência da célula em decorrência da exposição a agentes agressores, como radiação ultravioleta, calor, agentes infecciosos e EROs (CURI et al., 2005).

A glutamina contribui com a habilidade das células cancerosas de crescer e proliferar continuamente, através de fornecimento de ATP e biossíntese de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (DEBERARDINIS; CHEN, 2010). Pode modular homeostase redox e ter impacto na transdução de sinais (DAYE; WELLEN,

2012). A inibição de vias de sinalização intracelular é indicada como um mecanismo antiapoptótico, através da redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

O mecanismo de ativação de algumas dessas vias de sinalização é dependente do estado redox celular, que pode ser alterado de acordo com a concentração intracelular de GSH, que é influenciada pela disponibilidade de glutamina e glutamato intracelular. Assim, a ativação dessas vias pode ser modulada pela glutamina (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

O status redox também tem impacto na regulação de diversos genes envolvidos na transformação celular, proliferação e angiogenese, estimuladas por carcinógenos ou promotores de tumor (REUTER et al., 2010).

O estresse oxidativo também tem influência na regulação da expressão de proteínas de adesão intercelular, nas células endoteliais e epiteliais, que, juntamente com interleucinas, regula a migração transendotelial de neutrófilos e tem uma função em potencial na metástase tumoral (REUTER et al., 2010).

Durante a iniciação, os tumores frequentemente têm hipóxia, e sob esta condição, as células alteradas ativam sinalização de vias que regulam proliferação, angiogênese, permitindo sua sobrevivência e até seu crescimento. Essa adaptação do tumor à hipóxia contribui para seu fenótipo maligno e sua agressiva progressão (REUTER et al., 2010). Foi determinado que a expressão elevada de genes antiapoptóticos ou a expressão reduzida de genes proapoptóticos pode inibir a via mitocondrial de apoptose, que pode ter influência no prognóstico dos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Um dos mecanismos de desencadear a apoptose é dano oxidativo ao DNA (LIM et al., 2009).

Tumores sólidos induzem resposta angiogênica do hospedeiro, induzem seus vasos a formar uma nova rede vascular para supri-lo de nutrientes e oxigênio. Para aumentar de tamanho, células tumorais expressam um conjunto de moléculas que iniciam vascularização do tumor. Fatores de estresse celular, como hipóxia, privação de nutriente e EROs, são importantes fatores de estímulo à sinalização de angiogênese (REUTER et al., 2010).

A progressão tumoral deve envolver alterações genéticas e celulares, que são, em parte, dirigidas pelo estroma e microambiente do tumor. Macrófagos, no microambiente do tumor, produzem EROs e ERNs. O aumento de superóxidos,

peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, e ferro livre danificam o DNA, causando mutações genéticas e iniciam a progressão do câncer (REUTER et al., 2010).

Foi demonstrado que a suplementação de glutamina via oral inibiu completamente o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas, causando redução da GSH no tumor, e seu aumento no tecido normal. O desenvolvimento desse tumor está associado à depleção de glutamina na musculatura esquelética e redução do nível de GSH no sangue (LIM et al., 2009).

Glutamina é precursora da síntese de nucleotídeos, substrato para neoglicogênese hepática, e importante fonte de nutriente para células de divisão rápida, como as do epitélio gastrointestinal, linfócitos, fibroblastos e reticulócitos. Órgãos viscerais, enterócitos, linfócitos T e macrófagos utilizam glutamina mobilizada dos músculos e plasma como combustível (CAO et al., 2001).

Foi demonstrado que níveis plasmáticos de glutamina reduzem cerca de 58% após trauma ou doença grave e permanecem baixos até 3 semanas. Em estados catabólicos, observa-se que a glutamina é liberada dos músculos para nutrir enterócitos e células imunológicas. A deficiência de glutamina pode prejudicar as funções dos linfócitos e neutrófilos e depletar GSH. Assim a suplementação de glutamina pode estimular diversas funções e aprimorar a eficiência do sistema imune (WISCHMEYER, 2003).

A vitamina E é agrupada em oito compostos, entre tocoferóis e tocotrienóis. Diferentes isômeros de tocoferóis podem ser encontrados, entre eles o α -tocoferol. Sua absorção é controlada por difusão passiva. Dentro das células da mucosa, o α -tocoferol se combina com outros lipídeos e com as apoproteínas, tais como os quilomicrons. A partir de sua absorção, é incorporado aos quilomicrons e secretado na corrente linfática. A lipase lipoproteica hidrolisa os triacilglicéreis do quilomicrons, formando os quilomicrons remanescentes. Estes são captados pelo fígado via receptor específico para apolipoproteína-E localizados principalmente nas células do parênquima. Dentre os componentes da vitamina E, o α -tocoferol tem maior afinidade com a proteína ligadora de tocoferol presente nos hepatócitos e portanto maior liberação para o plasma, através de sua incorporação com a fração VLDL (*very low density protein*), para distribuição para os tecidos. As frações VLDL são metabolizadas similarmente aos quilomicrons pela lipase lipoproteica. Durante a lipólise, parte da vitamina E associada tanto aos quilomicrons quanto à VLDL é transferida para células periféricas e para a fração HDL (*high density lipoprotein*). Por

ocasião do metabolismo de VLDL também há formação de LDL (*low density protein*), que transporta vitamina E tanto para células periféricas quanto para as células do parênquima hepático. A proteína ligadora de tocoferol tem sido identificada também em enterócitos (BIANCHINI-PONTUSCHKA; PENTEADO, 2003).

Dentre todos os tocoferóis conhecidos, o α -tocoferol tem sido considerado o biologicamente mais ativo, inclusive no que diz respeito a sua atividade antioxidante, sendo o principal antioxidante lipossolúvel, nas membranas celulares. O fato de ser lipossolúvel confere ao α -tocoferol propriedade de se acumular no interior das membranas e protegê-las da lipoperoxidação, e ser transportado pelas lipoproteínase além de preservá-las (CAVALCA et al., 2009; PENTEADO, 2003).

O α -tocoferol da dieta é armazenado em vários tecidos, especialmente no fígado, tecido adiposo e músculo. A função oxidante da vitamina é, essencialmente, a captura de radicais peroxila e alcóxila, levando ao término da reação em cadeia da lipoperoxidação por formar um aduto não radicalar. Nesse processo, o α -tocoferol atua, doando um átomo de hidrogênio para estes radicais, derivados da oxidação de ácidos graxos. O radical peroxila, analogamente, oxida a vitamina E e produz o radical tocoferoxila, um radical estável, que não propaga a cadeia. Subseqüentemente, o radical tocoferoxila é regenerado à vitamina E pelo ácido ascórbico, mas GSH e ácido úrico também são agentes de regeneração no plasma. A completa oxidação do tocoferoxila gera o α -tocoferolquinona, por meio de reação irreversível. O mecanismo eficiente de regeneração do α -tocoferol permite pouca formação irreversível deste último radical. A explicação corrente é a de que, assim que o radical tocoferoxila é formado, o α -tocoferol é imediatamente regenerado, sugerindo que os níveis plasmáticos e teciduais de vitamina E sejam repostos por um “pool” mantido na forma não oxidada. Os animais são incapazes de sintetizar o α -tocoferol, sendo dependentes das fontes dietéticas (JORDÃO JUNIOR et al., 1998; LIEBLER, 1993).

Outro importante antioxidante lipossolúvel, protetor de lipoperoxidação é o retinol. O retinol, $C_{20}H_{30}O$, foi a primeira vitamina a ser identificada, por isso também é chamada de vitamina A. Essa vitamina tem várias funções como visão saudável, expressão de genes, reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação de células epiteliais e função imune. Essa vitamina lipossolúvel é hidrolisada por enzimas do suco gástrico, pancreático e intestinal, incorporado a micelas e absorvida. Na célula intestinal o retinol é reesterificado, incorporado aos

quilomicrons e excretado na linfa. Cerca de 90% do retinol é armazenado no fígado. Para atender a demanda dos tecidos, o retinol é transportado na circulação sanguínea complexado com a proteína carreadora de retinol (ALMEIDA-MURADIAN; PENTEADO, 2003).

Frente à participação do estresse oxidativo nas fases da carcinogênese, está sendo estudada a influência dos antioxidantes nessas fases. A quimioprevenção é a ferramenta utilizada para intervir precocemente em estágios pré-cancerosos, inibindo, retardando ou revertendo a carcinogênese, inclusive com o uso de antioxidantes.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Com a metodologia empregada pretendeu-se avaliar o efeito da suplementação de glutamina tópica e intragástrica na carcinogênese bucal DMBA-induzida, em mucosa de bolsa jugal de Hamsters Sírrio Dourados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ganho de peso dos animais ao longo do experimento;
- Dosar perfil antioxidante e marcadores de peroxidação lipídica no tecido hepático;
- Dosar glutathione no soro dos animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 35 Hamsters Sírio Dourados (*Mesocricetus auratus*) machos, com 2 meses de vida e, aproximadamente, 100g, provenientes da Universidade de São Paulo. Os animais foram acomodados em caixas plásticas, contendo, 05 animais cada. As caixas foram higienizadas diariamente, com trocas das caixas plásticas, lavagem, secagem e acondicionamento em maravalha do tipo pinus não pulverizada. Receberam ração padronizada e água *ad libitum*, com luminosidade parcial e indireta e luz artificial no período noturno, alternando ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente entre 25° e 30°C.

Após a instalação dos mesmos com as condições acima descritas, foram observados por uma semana, tempo necessário para adaptação dos animais ao ambiente.

Os hamsters foram randomizados e distribuídos aleatoriamente em sete grupos:

- Grupo controle
- DMBA 11 semanas (DMBA11)
- DMBA 15 semanas (DMBA15)
- DMBA + glutamina com administração tópica por 11 semanas (DMBAGT11)
- DMBA + glutamina com administração tópica por 15 semanas (DMBAGT15)
- DMBA + glutamina com administração via gavagem por 11 semanas (DMBAGG11)
- DMBA + glutamina com administração via gavagem por 15 semanas (DMBAGG15)

Seguindo a técnica padronizada (SALLEY, 1954), o carcinógeno, DMBA (Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA) na forma pó, foi diluído em acetona na concentração de 0,5%. A solução foi homogeneizada e acondicionada em vidro âmbar, rotulada e conservada em geladeira a 4°C, no Laboratório de Processamento Histotécnico da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. A solução foi aplicada diretamente na bolsa jugal direita dos animais, em dias alternados, com um pincel pelo de camelo número quatro, sendo um pincel exclusivo para o DMBA.

Os grupos DMBAGT11 e DMBAGT15, com administração tópica, receberam 0,5g/Kg de peso/dia de glutamina (Ajinomoto, Brasil), em concentração de 3,75g/100ml de água aplicada em bolsa jugal direita com pincel específico para esse

fim. Os grupos DMBAGG11 e DMBAGG15 receberam quantidade equivalente, em volume inferior a 4ml para evitar aspiração, via gavagem, sem contato com a cavidade bucal. O grupo C recebeu volume equivalente a quantidade de glutamina diluída em água na bolsa jugal direita, com pincel exclusivo para esse fim. Os animais foram pesados semanalmente para determinação da quantidade de glutamina a ser administrada. A administração de glutamina foi realizada diariamente e sua aplicação teve início e término juntamente com a aplicação de DMBA, durante todo experimento. Durante a aplicação das substâncias, os animais foram contidos mecanicamente, sem necessidade de anestesia. Respeitou-se intervalo mínimo de 3 horas entre as mesmas, a fim de evitar uma possível reação entre as substâncias ou interferência da manipulação do animal.

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados associando-se, cloridrato de quetamina a 10%, com cloridrato de xilazina via intramuscular, na proporção de 0,1mL/100g e 0,01mL/100g de peso corporal, em seguida coletou-se amostra de sangue por punção cardíaca; seguida de eutanásia por dose excessiva de anestésico. Logo após, foi realizada a necropsia com remoção da mucosa da bolsa jugal, mucosa bucal e do fígado do animal.

Foi retirado o fígado de cada animal, pesado, embalado em papel alumínio, prensado e armazenado em -80°C até o uso.

Não foram coletadas amostras do tumor para quantificação bioquímica pois a quantidade de tecido era insuficiente.

Para obtenção do soro foi coletada uma amostra de sangue de cada animal, protegida da luz, centrifugada a 3.500 rpm sob refrigeração (4°C) por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos, protegidos da luz, aliquotados e congelados a -80°C até o uso.

A mucosa de bolsa jugal, a mucosa bucal e a língua de cada animal foram colocadas em frascos de vidro identificados individualmente fixadas com formaldeído tamponado a 10% por 48 horas. Em seguida, foram processadas no histotécnico e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram laminados, obtidas 2 lâminas de cada um deles, contendo cerca de 8 cortes de tecido, com espessura de 5 micrometros, em micrótomo Spencer 820, American Optical Company, EUA, com navalhas descartáveis. Os cortes foram corados pela técnica histoquímica da hematoxilina e eosina.

Figura 2 - Contenção mecânica do animal e aplicação tópica com pincel

Figura 3 - Contenção mecânica do animal e aplicação intragástrica com agulha

Para o diagnóstico histopatológico foi considerado o tecido com maior alteração histopatológica, pois consideramos que aplicação e a movimentação da boca do animal possa ter distribuído o carcinógeno na cavidade bucal.

A análise microscópica cega foi realizada por 2 examinadores previamente calibrados seguindo critério de classificação da Organização Mundial da Saúde (SLOOTWEG; EVERSON, 2005).

♦ *Hiperplasia epitelial*: aumento do número de células da camada espinhosa (acantose) e/ou da camada basal/suprabasal, porém sem atipia celular;

♦ *Displasia epitelial leve*: alteração da arquitetura epitelial limitada ao terço inferior do epitélio com presença de atipia celular;

♦ *Displasia epitelial moderada*: alteração da arquitetura epitelial estendendo-se ao terço médio, com atipia celular;

♦ *Displasia epitelial severa*: mais de 2/3 do epitélio com alteração da arquitetura epitelial associado a atipia celular;

♦ *Carcinoma in situ*: alterações da arquitetura epitelial atingindo toda ou quase toda espessura do epitélio associada a acentuada atipia celular com presença de figuras de mitose e/ou mitoses superficiais atípicas.

♦ *Carcinoma microinvasivo*: destruição da membrana basal do epitélio pelas células neoplásicas atípicas, com invasão localizada e restrita à lâmina própria.

♦ *Carcinoma invasivo*: destruição da membrana basal do epitélio pelas células neoplásicas atípicas, com invasão comprometendo a lâmina própria e submucosa.

São consideradas alteração da arquitetura epitelial:

- Estratificação irregular do epitélio;
- Perda da polaridade das células basais;
- Cristas epiteliais em forma de gota;
- Aumento do número de figuras mitóticas;

- Mitoses superficiais atípicas;
- Queratinização prematura das células individuais (disqueratose);
- Pérolas de queratina no interior das cristas epiteliais;
- Diminuição da coesão celular;

As seguintes alterações celulares são consideradas:

- Alteração no tamanho do núcleo;
- Alteração na forma do núcleo (pleomorfismo nuclear);
- Hiperchromatismo nuclear;
- Alteração no tamanho da célula;
- Alteração na forma da célula (pleomorfismo celular);
- Alteração na relação núcleo/citoplasma;
- Figuras de mitoses atípicas;
- Aumento no número e tamanho dos nucléolos.

A análise de MDA foi feita de acordo com o método estabelecido por Gerard-Monnier (1998), com algumas adaptações. Foi pesada uma amostra de 100mg de tecido hepático o qual foi homogeneizado em 1ml de solução de KCL 1%. Desse homogenato foram retirados 220µl e transferidos a microtubos. A este foi adicionado 650µl de solução de 10mM de 1-metil-fenitol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 150µl de HCL puro (37%). Logo após, os eppendorfs foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, os eppendorfs foram centrifugados a 4000rpm por 15 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorbância com comprimento de onda de 586nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3- tetrametonipropano (TMP) hidrolisado. A hidrólise do TMP foi feita diluindo-se 25µl deste em 10ml de H₂SO₄ 1%. Essa solução permaneceu em temperatura ambiente por duas horas. Logo

após, retirou-se 83µl os quais foram diluídos com água mili-Q em um balão de 10ml (concentração final de 100µM). Dessa solução foi retirado 1ml e feita uma nova diluição em balão de 10ml, deixando esta solução com concentração de 10µM, da qual foram feitas diluições seriadas para a obtenção da curva padrão.

A quantificação da glutatona reduzida (GSH) sérica foi feita segundo método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Foi utilizada uma alíquota de 25 ml de soro com a adição de 1ml do tampão Tris-EDTA para a realização da primeira leitura no comprimento de onda de 412nm, obteve-se A1. Posteriormente, 25 ml do DTNB foram adicionados a esta solução e após 15 minutos de reação a temperatura ambiente, foi realizada a segunda leitura, obtendo-se A2, contra um branco de DTNB. Após a subtração dos valores obtidos A2-A1, a concentração na amostra foi calculada utilizando-se, uma curva padrão de GSH, expressa em mmol/L.

A determinação de proteína no fígado e soro foi realizada por kit comercial utilizando o método de Biureto (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Para a análise em fígado, este foi homogeneizado em tampão fosfato e retirada uma alíquota de 10µl. Após a reação, a leitura foi realizada em 545nm.

A análise de α -tocoferol e retinol foi realizada baseado em Arnaud et al. (1991) e descrito em Jordão Junior et al. (2004), em amostras de fígado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna tipo C-18 (Shimpack CLC-ODS 4,6 x 25 cm), pré-coluna 4 mm x 1 cm e fluxo de 2,0 mL/min. Foram pesados 200mg de tecido e homogeneizados com 200µl de etanol absoluto com BHT (0,125%), em seguida adicionou-se 400µl de hexano para extração. As amostras foram agitadas por 2 minutos, para posterior centrifugação (4000 rpm durante 5 min). O sobrenadante foi retirado, cerca de 200µl, e seco ao fluxo de nitrogênio. A ressuspensão do resíduo seco foi realizada com 200µl da fase móvel Acetonitrila/Diclorometano/Metanol na proporção 70/20/10. O α -tocoferol foi submetido à cromatografia com leitura no comprimento de onda 292 nm, enquanto que o retinol de 325nm. A concentração foi calculada por meio de um padrão externo de α -tocoferol e retinol, respectivamente.

Para a análise estatística foi realizado teste Shapiro-Wilk para verificação de normalidade para todas as variáveis, e então teste de variância pelo teste Tukey para as variáveis normais e Kruskal-Wallis e Dunn para as não-normais. Foi calculado o índice kappa para a avaliação de concordância entre os diagnósticos

dos dois avaliadores. Foi considerado valor de p menor que 0,05 para diferenças estatísticas significativas.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Todos os animais que receberam aplicação de DMBA 0.5% desenvolveram algum grau de alteração histológica, de hiperplasia e hiperqueratose com displasia até carcinoma invasivo de células escamosas em mucosa de bolsa jugal.

O grupo controle apresentou mucosa de bolsa jugal normal, composta por epitélio escamoso estratificado ortoqueratinizado, 2 a 4 camadas de células, tecido conjuntivo fibroso denso sem glândulas ou estruturas acessórias, sem vasos linfáticos visíveis, camada muscular de fibras estriadas e mais profundamente tecido conjuntivo frouxo com estruturas acessórias (Figura 4).

Entre os 30 animais que receberam DMBA, 1 morreu, e dos 29 restantes 79,3% desenvolveram carcinoma de células escamosas e 20,7% apresentaram hiperplasia e hiperqueratose com displasia moderada ou intensa, independente da administração de glutamina (Tabela 1).

O epitélio displásico sem carcinoma apresentou-se com hiperplasia e hiperqueratose, perda de polaridade das células da camada basal, várias camadas de células com padrão basalóide, aumento do índice núcleo/citoplasma, grande quantidade de figuras de mitose, intenso pleomorfismo celular, intenso hiperchromatismo nuclear, nucléolos evidentes, diminuição da coesão celular, disqueratose moderada a intensa, cristas epiteliais irregulares, estratificação epitelial irregular e mitoses atípicas (Figuras 5, 6 e 7).

O carcinoma de células escamosas foi diagnosticado por apresentar hiperplasia e hiperqueratose, perda da estratificação celular, acantose, células displásicas, núcleos hiperchromados, pleomorfismo, diversas figuras de mitoses atípicas, disqueratose e pérolas de queratina. No conjuntivo subjacente, observaram-se ilhas e cordões de células tumorais, além de infiltrado inflamatório intenso em alguns casos e moderado em outros. O carcinoma foi classificado em microinvasivo ou invasivo quando houve destruição da membrana basal do epitélio pelas células neoplásicas atípicas, com invasão comprometendo a lâmina própria e submucosa (Figuras 8, 9 e 10).

O índice kappa calculado entre os examinadores das lâminas resultou em 0,79 que demonstra concordância satisfatória entre eles.

Tabela 1 - Alterações histopatológicas em epitélio de mucosa de bolsa jugal

Grupo	Tempo (semanas)	Mucosa normal	Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia leve	Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia moderada	Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia intensa	Carcinoma
CONTROLE	11	5	0	0	0	0
	15	5	0	0	0	0
DMBAGT	11	0	0	1	1	3
	15	0	0	0	0	5
DMBAGG	11	0	0	0	2	2
	15	0	0	0	0	5
DMBA	11	0	0	0	1	3
	15	0	0	0	0	5

Figura 4 - Mucosa normal de bolsa jugal com epitélio escamoso estratificado ortoqueratinizado, 2 a 4 camadas de células, tecido conjuntivo denso camada muscular de fibras estriadas e mais profundamente tecido conjuntivo frouxo (H.E., 50X)

Figura 5 - Mucosa de bolsa jugal com epitélio escamoso estratificado hiperplásico e hiperortoqueratinizado, com displasia intensa, hiper Cromatismo, pleomorfismo, perda de polaridade celular, diversas figuras de mitose. Subjacente, tecido conjuntivo denso (H.E., 200X)

Figura 6 - Mucosa de bolsa jugal apresentando formação papilomatosa, com epitélio escamoso estratificado hiperplásico e hiperortoqueratinizado, com displasia intensa. Subjacente, tecido conjuntivo fibroso denso com infiltrado inflamatório (H.E., 25X)

Figura 7 - Em maior aumento, observa-se displasia intensa, hiperchromatismo, hiperchromatismo, pleomorfismo, disqueratose, pérolas de queratina no conjuntivo. Subjacente, tecido conjuntivo fibroso denso com infiltrado inflamatório (H.E., 100X)

Figura 8 - Em maior aumento, o epitélio displásico, observam-se figuras de mitose atípicas, hiperchromatismo, pleomorfismo, disqueratose e pérolas de queratina (H.E., 400X)

Figura 9 - Carcinoma de células escamosas. Epitélio escamoso estratificado com hiperplasia e hiperqueratose, acantose, células displásicas, núcleos hiperchromados e pérolas de queratina. No conjuntivo, observaram-se ilhas e cordões de células tumorais, além de infiltrado inflamatório moderado (H.E., 25X)

Figura 10 - Em maior aumento, epitélio displásico, observam-se figuras de mitose atípicas, hiperchromatismo e pleomorfismo (H.E., 400X)

Nos animais estudados não foi observada diferença significativa no ganho de peso entre os grupos experimentais ao longo do tempo, conforme Tabela 2, que apresenta os dados em média e $\pm$ desvio padrão.

Tabela 2 - Ganho de peso ao final do experimento

Grupo	Tempo (semanas)	Ganho de peso (g)
CONTROLE	15	45,6 $\pm$ 15,8
DMBAGT	11	18,6 $\pm$ 18,9
	15	22 $\pm$ 27,2
DMBAGG	11	34,75 $\pm$ 6,7
	15	24,8 $\pm$ 13,1
DMBA	11	21,6 $\pm$ 10,8
	15	18,6 $\pm$ 17,9

Não houve diferença na concentração de MDA, GSH e proteínas totais no fígado dos animais como demonstrado na Tabela 3, que apresenta os dados em mediana ou média e $\pm$ desvio padrão.

Tabela 3 - Valores de MDA, proteína e GSH no fígado

Grupo	Tempo (semanas)	MDA (nmol/g ptn)	GSH (μ mol/g ptn)	PTN (g/g tecido)
CONTROLE	15	55,659	1,1403 $\pm$ 0,0497	0,182
DMBAGT	11	39,248	1,0057 $\pm$ 0,2039	0,215
	15	39,74	1,1517 $\pm$ 0,0886	0,228
DMBAGG	11	46,401	1,0310 $\pm$ 0,0396	0,224
	15	32,972	1,0486 $\pm$ 0,1071	0,251
DMBA	11	29,747	1,1561 $\pm$ 0,1304	0,237
	15	23,956	1,0885 $\pm$ 0,1505	0,219

A concentração de retinol presente no fígado não foi diferente entre os grupos, enquanto que a concentração de α -tocoferol hepática foi maior nos grupos com tempo experimental de 15 semanas em comparação com o controle, independente da administração de glutamina, conforme demonstrado na Tabela 4, que apresenta os dados em média e $\pm$ desvio padrão.

Tabela 4 - Valores de Retinol e α -Tocoferol no fígado

Grupo	Tempo (semanas)	Retinol (nmol/g tecido)	α - Tocoferol (nmol/g tecido)
CONTROLE	15	13,1889 $\pm$ 8,3042	69,3667 ^a $\pm$ 17,2513
DMBAGT	11	8,2958 $\pm$ 1,0559	118,1605 $\pm$ 6,4755
	15	13,8561 $\pm$ 14,7586	136,5242 ^b $\pm$ 31,3056
DMBAGG	11	18,9304 $\pm$ 23,9409	77,5414 $\pm$ 14,1468
	15	19,1425 $\pm$ 12,6495	106,5661 ^b $\pm$ 19,7779
DMBA	11	11,0053 $\pm$ 2,4599	98,0900 $\pm$ 17,4220
	15	15,2822 $\pm$ 7,7644	13,0048 ^b $\pm$ 19,2724

A concentração de GSH não foi diferente entre o soro dos animais, conforme demonstrado na Tabela 5, com valores em média e $\pm$ desvio padrão.

Tabela 5 - Valores de GSH em soro

Grupo	Tempo (semanas)	GSH (mmol/g ptn)
CONTROLE	15	8,9390 $\pm$ 0,7546
DMBAGT	11	10,5115 $\pm$ 1,2544
	15	14,3262 $\pm$ 5,5359
DMBAGG	11	13,7162 $\pm$ 9,8404
	15	15,5917 $\pm$ 3,6866
DMBA	11	12,6627 $\pm$ 2,2669
	15	17,5651 $\pm$ 6,9807

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Diversos nutrientes e substâncias isoladas de alimentos têm sido testados no modelo de indução de carcinogênese utilizado neste estudo, o DMBA-induzido em mucosa de bolsa jugal de hamsters. Algumas delas inibiram eficientemente a formação do tumor maligno, como o chá verde e preto (SUBAPRIYA; VELMURUGAN; NAGINI, 2005), o ácido ferúlico (BALAKRISHNAN; MENON; MANOHARAN, 2008), o 6-paradol (SURESH et al., 2010), vitamina E (SAWANT; KANDARKAR, 2000) e, inclusive, a glutamina (LIM et al., 2009).

Cumprindo-se o protocolo escolhido, as mucosas de bolsa jugal foram pinceladas com solução de DMBA a 0,5% diluída em acetona, por 11 ou 15 semanas, em dias alternados. Em concordância com estudos clássicos (MORRIS, 1961; SALLEY, 1954) os animais tratados com o carcinógeno DMBA desenvolveram alguma alteração histopatológica, ou hiperplasia e hiperqueratose com algum grau de displasia ou carcinoma de células escamosas. A carcinogênese ocorreu independente do tempo de aplicação do carcinógeno e da administração de glutamina, tópica ou intragástrica. Não houve associação significativa entre a substância e alterações histopatológicas observadas. Anteriormente foi demonstrado que, pincelada na dose de 1g/Kg de peso corporal, a glutamina inibiu completamente a formação de carcinoma de células escamosas nesse modelo (LIM et al., 2009) e também em tecido mamário (KAUFMANN; SPRING; KLIMBERG, 2008). Diante da divergência de resultados entre uso de 1 e 0,5g/Kg de peso corporal, suspeitamos que essa quantidade pode não ter sido suficiente para influenciar a carcinogênese.

As alterações na mucosa atingida não alteraram o ganho de peso dos animais. Conforme esperado para a idade, eles ganharam peso ao longo do tempo, sem diferença significativa entre os grupos.

Conforme levantamento bibliográfico, sabe-se que a metabolização do DMBA ocorre através da geração de espécies reativas de oxigênio, o que eleva a oxidação intracelular e pode se difundir a partir do local de geração, para fora da célula, e iniciar a cadeia de peroxidação lipídica (ARULKUMARAN et al., 2007; CAO et al., 2001). Encontram-se alterações no fígado do animal ao ter sua mucosa de bolsa jugal pincelada, pois o DMBA é metabolizado nesse órgão (CHANDRA MOHAN et

al., 2005). Já foi demonstrado que a aplicação de DMBA por 14 semanas em bolsa jugal resultou em estresse oxidativo, por aumento da peroxidação lipídica e redução de antioxidantes no fígado dos hamsters. Sabe-se que antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos têm papel crucial contra o estresse oxidativo mediado por EROs. A redução de níveis de antioxidantes não-enzimáticos foi reportados em diversos tipos de carcinogênese (CAO et al., 2001). Essa redução sugere que esses antioxidantes são utilizados pelos tumores malignos para suprimento de nutrientes para seu crescimento ou para combater efeitos deletérios na circulação (SURESH et al., 2010). Algumas substâncias que influenciaram a carcinogênese reestabeleceram os níveis de antioxidantes (BALAKRISHNAN; MENON; MANOHARAN, 2008; SUBAPRIYA; VELMURUGAN; NAGINI, 2005; SURESH et al., 2010).

Neste experimento, para determinação do perfil oxidante, foram dosados um biomarcador de peroxidação lipídica, o MDA, o principal aldeído gerado durante essa reação em cadeia (SIDDIQUE; ARA; AFZAL, 2012), e antioxidantes GSH, α -tocoferol e retinol. Porém, observou-se que a administração e a metabolização do DMBA não alterou níveis de peroxidação lipídica no fígado, e tampouco reduziu os níveis de GSH, α -tocoferol e retinol. Admitiu-se, então, que não houve estresse oxidativo significativo nesses animais.

A GSH é a primeira linha de defesa contra oxidantes, e pode ser regenerada com administração de vitamina E, por um mecanismo não esclarecido completamente (AHMED et al., 2006). O fígado, rico em GSH, supre vários tecidos através de um sistema de transporte, que preserva o fígado quando é desafiado por xenobióticos, EROs e componentes tóxicos. Juntamente com GPx e GTS, detoxifica espécies reativas intermediárias geradas durante o metabolismo do DMBA. A depleção de GSH e enzimas dependentes de GSH no fígado para eliminar peróxidos de lipídeos pode deslocar o estado redox para estresse oxidativo (LOCIGNO; CASTRONOVO, 2001).

A administração de glutamina, tópica ou intragástrica, poderia restaurar os níveis de GSH como já demonstrado, caso estivessem sido depletados em situação de estresse oxidativo. Poderia ter-se avaliado se a quantidade de 0,5g/Kg de peso seria suficiente para suprir substrato para o aumento de GSH.

Não foram encontrados trabalhos que dosaram a quantidade de α -tocoferol no fígado de animais tratados com DMBA na cavidade bucal. Mas, foi realizada em modelos de carcinoma mamário DMBA-induzido. Em um deles, o grupo com DMBA

mostrou aumento da quantidade de α -tocoferol no tecido hepático e tumoral, quando comparado com o controle. Da mesma maneira, mostrou aumento de MDA e redução do GSH em ambos os tecidos. Foi discutido que essa redução de GSH pode ter sido consequência do estresse oxidativo e da ausência de substrato para sua síntese (PADMAVATHI et al., 2006).

No presente estudo foi observado aumento de α -tocoferol no fígado dos animais tratados com DMBA por 15 semanas e não foi dosado seu nível no tecido tumoral. No entanto, baseado no artigo supracitado, consideramos que o tecido tumoral também apresentaria níveis elevados da vitamina, pois as células agredidas a requerem e as tumorais a necessitam para seu crescimento.

Outra possibilidade seria estar havendo um acúmulo de α -tocoferol no fígado proporcional ao acúmulo de lipídeos. Os valores de α -tocoferol não foram corrigidos pela quantidade de gordura e podem, portanto, estarem falsamente elevados. O fígado pode apresentar acúmulo de gordura em resposta a agressão. O hipotético desequilíbrio entre lipogênese *de novo*, triglicérides hepáticos da dieta e tecido adiposo, exportação de lipídeos do fígado pela VLDL (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade) e oxidação de lipídeos, pode ser consequência da alteração da expressão genética secundária a inflamação e sinais endócrinos entre outros (MOUZAKI; ALLARD, 2012).

Não foi possível avaliar a presença de esteatose hepática, pois o material não foi conservado para esse fim. Todavia, analisamos lâminas de fígados de animais tratados com DMBA aplicado em mucosa de bolsa jugal de hamsters por 7, 11 e 20 semanas em um estudo previamente realizado em nosso laboratório (PEDREIRA, 2007). Porém, da mesma maneira, não foram encontradas alterações morfológicas consideráveis comparando-se com controle do referido estudo.

De qualquer maneira, esse acúmulo de α -tocoferol no fígado pode ter contribuído para a manutenção dos níveis de MDA. Os animais integrantes dos grupos com maior tempo de experimento provavelmente teriam apresentado maiores níveis de MDA no fígado, não fosse a quantidade abundante de α -tocoferol para proteger esse órgão.

Na circulação sanguínea, teoricamente, o consumo de antioxidantes prioriza GSH em relação a vitamina E, já que são substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas respectivamente. Por isso, priorizamos a dosagem de GSH no soro. Além de níveis de antioxidantes serem ferramentas úteis na estimativa de dano oxidativo na

carcinogênese (PADMAVATHI et al., 2006). Conforme tabulado, esses resultados não foram diferentes entre os grupos.

Contraditoriamente ao encontrado no presente, em um estudo de indução de carcinoma de células escamosas de mucosa de bolsa jugal via DMBA foi demonstrada redução de GSH no plasma. Foram reduzidas, também, quantidades de α -tocoferol e vitamina C, e aumentadas as de marcadores de peroxidação lipídica no plasma do grupo com carcinoma em relação ao controle. A redução de antioxidantes foi justificada por sua utilização pelos tecidos para seu crescimento, e combate aos efeitos deletérios de EROs. Atividade enzimática reduzida (inclusive GPx) confirmou o estresse oxidativo no modelo de carcinogênese de mucosa de bolsa jugal em hamster DMBA-induzido. O aumento da lipoperoxidação foi correlacionado ao potencial antioxidante insuficiente nesse experimento (BALAKRISHNAN; MENON; MANOHARAN, 2008; SURESH et al., 2010).

Entretanto, no estudo de Lim et al. (2009) a aplicação de DMBA não influenciou a quantidade de GSH do sangue arterial em relação ao controle, assim como nos resultados aqui apresentados. Tampouco foram encontradas diferenças significativas nos níveis de GSH no tecido do tumor tratado com DMBA em relação ao controle. Assim como o nosso estudo, esses resultados são contrários ao que já existia na literatura anteriormente (ZHANG; MOCK, 1991). Todavia, a aplicação de glutamina aumentou a quantidade de GSH no plasma, nos grupos com ou sem DMBA, enquanto que no presente estudo não houve diferença. Possivelmente, essa disparidade de resultados deve-se à quantidade de glutamina utilizada em cada experimento.

Na literatura, existem dados sobre o perfil oxidante da mucosa jugal afetada, onde foi induzido a carcinogênese, que mostram reduzida peroxidação lipídica associada a aumento de GSH. A baixa peroxidação lipídica nesse tecido pode ser atribuída ao aumento de GSH, que está envolvida na eliminação de EROs, detoxificação e regulação da proliferação celular (BALAKRISHNAN; MENON; MANOHARAN, 2008; CHANDRA MOHAN et al., 2005; SURESH et al., 2010).

Neste estudo não foram dosados níveis de peroxidação lipídica e antioxidantes no tecido do tumor, devido a quantidade insuficiente para análise. Porém, apesar de não ter sido observada diferença do perfil oxidante do soro e fígado desses animais, possivelmente o tecido tumoral teve alteração do perfil oxidante.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados confrontando-se com outros estudos, conclui-se que a administração de glutamina, na quantidade de 0,5g/Kg de peso corporal, não foi eficiente na inibição da carcinogênese induzida por DMBA na mucosa de bolsa jugal de hamsters. Possivelmente, a glutamina não influenciou o perfil oxidativo, pois o carcinógeno não causou grande estresse oxidativo nesses animais.

Considera-se interessante reproduzir o experimento com aplicação de 1g de glutamina por quilograma de peso do animal para confirmar a inibição da carcinogênese relata por outros autores e dosar oxidantes e antioxidantes nessa situação.

Devem ser realizados mais testes para que o inesperado acúmulo hepático de α -tocoferol nos animais com maior tempo de exposição ao carcinógeno seja esclarecido.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AHMED, R. S. et al. Impact of oral vitamin E supplementation on oxidative stress and lipid peroxidation in patients with polymorphous light eruption. **Indian J Med Res**, New Delhi, v. 123, n. 6, p. 781-787, Jun. 2006.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PENTEADO, M. D. V. C. Vitamina A. In: PENTEADO, M. D. V. C. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, 2003. p. 55-72.
- ARNAUD, J. et al. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, Amsterdam, v. 572, n. 1-2, p. 103-116, Dec. 1991.
- ARULKUMARAN, S. et al. Alteration of DMBA-induced oxidative stress by additive action of a modified indigenous preparation--Kalpaamruthaa. **Chem Biol Interact**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 99-106, Apr. 2007.
- ARUNA, K.; SIVARAMAKRISHNAN, V. M. Plant products as protective agents against cancer. **Indian J Exp Biol**, New Delhi, v. 28, n. 11, p. 1008-1011, Nov. 1990.
- BALAKRISHNAN, S.; MENON, V. P.; MANOHARAN, S. Ferulic acid inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **J Med Food**, Larchmont, v. 11, n. 4, p. 693-700, Dec. 2008.
- BALASENTHIL, S. et al. Of humans and hamsters: comparative analysis of lipid peroxidation, glutathione, and glutathione-dependent enzymes during oral carcinogenesis. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v. 38, n. 4, p. 267-270, Aug. 2000.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-641, jul./ago. 2010.
- BELTRÃO-BRAGA, P.; TEIXEIRA, V.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. In: WAITZBERG, D. L. **Dieta, Nutrição e Câncer**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 79-87.
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. D. V. C. Vitamina E. In: PENTEADO, M. D. V. C. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, 2003. p. 123-155.

CAO, Y. et al. Effect of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) on gut glutathione metabolism. **J Surg Res**, New York, v. 100, n. 1, p. 135-140, Sep. 2001.

CAVALCA, V. et al. Glutathione, vitamin E and oxidative stress in coronary artery disease: relevance of age and gender. **Eur J Clin Invest**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 267-272, Apr. 2009.

CHANDRA MOHAN, K. V. et al. Comparative evaluation of the chemopreventive efficacy of green and black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. **Clin Biochem**, Tarrytown, v. 38, n. 10, p. 879-886, Oct. 2005.

CRUZAT, V. F.; PETRY, É. R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: Aspectos Bioquímicos, Metabólicos, Moleculares e Suplementação. **Rev Bras Med Esporte**, São Paulo, v.15, n. 5 , p. 392-397, set./out. 2009.

CURI, R. et al. Molecular mechanisms of glutamine action. **J Cell Physiol**, New York, v. 204, n. 2, p. 392-401, Aug. 2005.

DAS, S. et al. Oxidative stress in lymphocytes, neutrophils, and serum of oral cavity cancer patients: modulatory array of L-glutamine. **Support Care Cancer**, Berlin, v. 15, n. 12, p. 1399-1405, Dec. 2007.

DAYE, D.; WELLEN, K. E. Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. **Semin Cell Dev Biol**, London, v. 23, n. 4, p. 362-369, Jun. 2012.

DEBERARDINIS, R. J.; CHENG, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 29, n. 3, p. 313-324, Jan. 2010.

FANG, J.; SEKI, T.; MAEDA, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Adv Drug Deliv Rev**, Amsterdam, v. 61, n. 4, p. 290-302, Apr. 2009.

GERARD-MONNIER, D. et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol**, Washington, v. 11, n. 10, p. 1176-1183, Oct.1998.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p.1170-1179, ago. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer no Brasil**: dados dos registros de base populacional. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2010. 487 p.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2011. 118 p.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, Hoboken, v. 61, p. 69-90, Feb. 2011.

JONES, D. P. et al. Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Fundam Appl Toxicol**, Akron, v. 26, n. 1, p. 1-7, Jun. 1995.

JORDÃO JUNIOR, A. A. et al. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food Chem Toxicol**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 459-464, Mar. 2004.

JORDÃO JUNIOR, A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, jul./set. 1998.

KAUFMANN, Y.; SPRING, P.; KLIMBERG, V. S. Oral glutamine prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis via upregulation of glutathione production. **Nutrition**, Bethesda, v. 24, n. 5, p. 462-469, May 2008.

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp Toxicol Pathol**, Jena, v. 48, n. 5, p. 439-446, Jul. 1996.

LIEBLER, D. C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. **Crit Rev Toxicol**, v. 23, n. 2, p. 147-169, 1993.

LIM, V. et al. Glutamine prevents DMBA-induced squamous cell cancer. **Oral Oncol**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 148-155, Feb. 2009.

LOCIGNO, R.; CASTRONOVO, V. Reduced glutathione system: role in cancer development, prevention and treatment (review). **Int J Oncol**, Athens, v. 19, n. 2, p. 221-236, Aug. 2001.

MORRIS, A. L. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 40, n. 3, p. 3-15, Jan./Feb. 1961.

MOUZAKI, M.; ALLARD, J. P. The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic Fatty liver disease. **J Clin Gastroenterol**, New York, v. 46, n. 6, p. 457-467, Jul. 2012.

PADMAVATHI, R. et al. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. **Life Sci**, Amsterdam, v. 78, n. 24, p. 2820-2825, May 2006.

PEDREIRA, E. N. Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo de resina de copaíba *in natura* (*Copaifera reticulata*) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental DMBA induzida. 2007. 169 p. Tese (doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

PENTEADO, M. D. V. C. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, 2003. 612 p.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, Dec. 2010.

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

SANTOS, P. C. B. Estresse Oxidativo. In: WAITZBERG, D. L. **Dieta, Nutrição e Câncer**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 98-105.

SAWANT, S. S.; KANDARKAR, S. V. Role of vitamins C and E as chemopreventive agents in the hamster cheek pouch treated with the oral carcinogen-DMBA. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 6, n. 4, p. 241-247, Jul. 2000.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, Orlando, v. 25, n. 1, p. 192-205, Oct. 1968.

SHKLAR, G. Development of experimental oral carcinogenesis and its impact on current oral cancer research. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 78, n. 12, p. 1768-1772, Dec. 1999.

SIDDIQUE, Y. H.; ARA, G.; AFZAL, M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. **Dose Response**, Amherst, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2012.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, New York, v. 91, n. 3C, p. 31S-38S, Sep. 1991.

SLOOTWEG, P.; EVESON, J. Pathology and Genetics of head and neck tumours. In: BARNES, L. et al. **World Health Organization Classification of tumours**. (Ed.). Lyon: IACR Press, 2005. p. 378-421.

SUBAPRIYA, R.; VELMURUGAN, B.; NAGINI, S. Modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes by ethanolic neem leaf extract during hamster buccal pouch carcinogenesis. **J Exp Clin Cancer Res**, London, v. 24, n. 2, p. 223-230, Jun. 2005.

SURESH, K. et al. Chemopreventive and antioxidant efficacy of (6)-paradol in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Pharmacol Rep**, Kraków, v. 62, n. 6, p. 1178-1185, Nov./Dec. 2010.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sci**, Amsterdam, v. 51, n. 14, p. 1083-1094, 1992.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

WEI, H. Activation of oncogenes and/or inactivation of anti-oncogenes by reactive oxygen species. **Med Hypotheses**, New York, v. 39, n. 3, p. 267-270, Nov. 1992.

WISCHMEYER, P. E. Clinical applications of L-glutamine: past, present, and future. **Nutr Clin Pract**, Thousand Oaks, v. 18, n. 5, p. 377-385, Oct. 2003.

ZHANG, L.; MOCK, D. Alteration in glutathione level during carcinogenesis of hamster buccal pouch mucosa. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 70, n. 7, p. 1061-1063, Jul. 1991.

ZIECH, D. et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chem Biol Interact**, Amsterdam, v. 188, n. 2, p. 334-339, Nov. 2010.