



## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IMUNOTERAPIA EM CÂNCER DE BOCA (CEC)

**Palavras-Chave:** CÂNCER DE BOCA, IMUNOTERAPIA, CARCINOMA ESPINOCELULAR

**Autores(as):**

**Gabriele dos Santos Ferreira, IB - UNICMAP**

**Ingrid Ferreira de Avelar, IB - UNICMAP**

**Maria Luiza Alcântara De Araújo Ferreira, IB - UNICMAP**

**Prof. Dr. Paulo Henrique F. Caria (Orientador), IB - UNICAMP**

---

### INTRODUÇÃO:

As baixas taxas de sobrevivência em combinação com toxicidades significativas causadas pelas atuais estratégias de tratamento usadas no carcinoma espinocelular oral (CEC) reforçam a necessidade urgente de opções terapêuticas mais efetivas. Tem sido amplamente aceito que o sistema imunológico desempenha um papel crucial no desenvolvimento do câncer, pois as células tumorais evitam a imunovigilância explorando as vias de *checkpoint* inibitórias que suprimem as respostas antitumorais das células T [1]. O CEC tem sido intensamente estudado como uma doença imunossupressora [2]. Após a crescente compreensão dos mecanismos subjacentes ao controle de doenças malignas pelo sistema imunológico, o estabelecimento de terapias imunológicas surgiu como uma abordagem promissora para o tratamento do câncer. Diante desse cenário, nosso grupo de pesquisa desenvolveu a imunoterapia OncoTherad® (MRB-CFI-1), a qual tem apresentado resultados positivos no tratamento de diferentes tumores sólidos [3].

O OncoTherad® (MRB-CFI-1) é um composto nanométrico de fosfato e sais metálicos associado a uma proteína glicosídica, capaz de ativar o sistema imune inato através das vias de sinalização mediadas por receptores toll-like (TLR), deflagrando uma resposta inflamatória aguda sistêmica. Assim, o presente estudo teve como objetivo acompanhar os procedimentos que visam avaliar o potencial terapêutico da imunoterapia OncoTherad® (MRB-CFI-1) [4] no tratamento do CEC quimicamente induzido em ratos, bem os possíveis mecanismos de ação dessa imunoterapia no funcionamento de fatores e vias de sinalização interrelacionadas e implicadas no complexo microambiente da carcinogênese do CEC, constituindo um panorama informativo sobre o perfil da resposta inflamatória/ imune frente ao tratamento.

### OBJETIVO

Identificar e discutir os elementos constituintes das células normais (não cancerígenas), os princípios/mecanismos genéticos básicos de formação do câncer, as principais causas do câncer bucal no

Brasil e no mundo. as características clínicas do câncer bucal, os locais mais frequentemente acometidos pelo câncer bucal, os tratamentos do câncer bucal (Quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, cirurgias), realizar biópsia excisional de lesão tumoral e acompanhar as etapas de construção de uma lâmina de tecido tumoral para diagnóstico de câncer e por fim analisar as características citológicas/histológicas do CEC.

## **METODOLOGIA**

Antes de iniciar as atividades práticas relativas ao acompanhamento do experimento de indução de câncer de boca em ratos e a avaliação dos efeitos do OncoTherad® (MRB-CFI-1) – imunoterapia, no tratamento do CEC, foram realizadas reuniões de discussão de assuntos relativos ao projeto, como a busca de artigos científicos em bases de dados via internet; identificação e compreensão das funções das organelas celulares normais; estudo do mecanismos genéticos básicos do câncer; principais causas do câncer bucal no Brasil e no mundo; características clínicas do câncer bucal; formas de tratamento do CEC (Quimioterapia, radioterapia); características citológicas/histológicas do CEC e princípios básicos das imunoterapias para tratamento do CEC. Após essas etapas, foram acompanhadas os experimentos realizados em 60 ratos machos da linhagem Fischer 344 (F344/NTacUnib) com 80 dias de idade e peso médio de 200g. O CEC foi induzido no lado esquerdo do lábio inferior de 30 ratos pela aplicação tópica de 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA). Um grama de DMBA foi diluído em 200 mL de acetona para obter uma solução a 0,5%, e aplicado em dias alternados por 20 semanas. Após o período de indução, os animais foram divididos em 04 grupos (n=15 animais por grupo): Grupo Controle: animais não-induzidos ao CEC receberam uma dose intraoral de 0,3 mL de solução fisiológica 0,9%, uma vez por semana durante 06 semanas consecutivas; Grupo Controle+OncoTherad®: animais não-induzidos ao CEC receberam uma dose intraoral de 0,3 mL de OncoTherad® (MRB-CFI-1; 20 mg/mL), uma vez por semana durante 06 semanas consecutivas; Grupo Câncer: animais induzidos ao CEC receberam o mesmo tratamento que os animais do Grupo Controle; Grupo Câncer+OncoTherad®: animais induzidos ao CEC receberam o mesmo tratamento que o Grupo Controle+OncoTherad®. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e, as lesões tumorais e o tecido oral normal foram coletados e submetidos às análises macroscópicas, histopatológicas e imunoistoquímicas. [5,6]

Foram analisados também o peso corporal e consumos de ração e água dos animais no início do experimento e após o período de indução do câncer de boca, bem como no final dos diferentes tratamentos. Tanto o peso corporal como os consumos de ração e água foram aferidos semanalmente durante todo o período experimental. O volume tumoral foi determinado medindo-se o diâmetro médio das lesões produzidas no lábio inferior dos animais com paquímetro digital e substituindo os valores na seguinte fórmula:  $V = 4/3 \times \pi \times d$  (V, volume tumoral;  $\pi = 3,14$ ; d, diâmetro).

Após a eutanásia dos animais foram realizadas as biópsias das lesões e amostras das lesões tumorais e do tecido oral normal de todos os animais de cada grupo experimental foram submetidas a análise histopatológica. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior

desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e inclusos em polímeros plásticos (*Paraplast Plus*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Depois, os materiais foram seccionados no micrótomo *Slee CUT5062 RM 2165* (Slee Mainz, Mainz, Alemanha) com espessura de 5 micrômetros, corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografados no fotomicroscópio *DM2500* (Leica, Munique, Alemanha). Os cortes histológicos corados por HE foram classificados em tumores de baixo e alto graus, de acordo com o sistema proposto por Anneroth et al. (1987) [7].

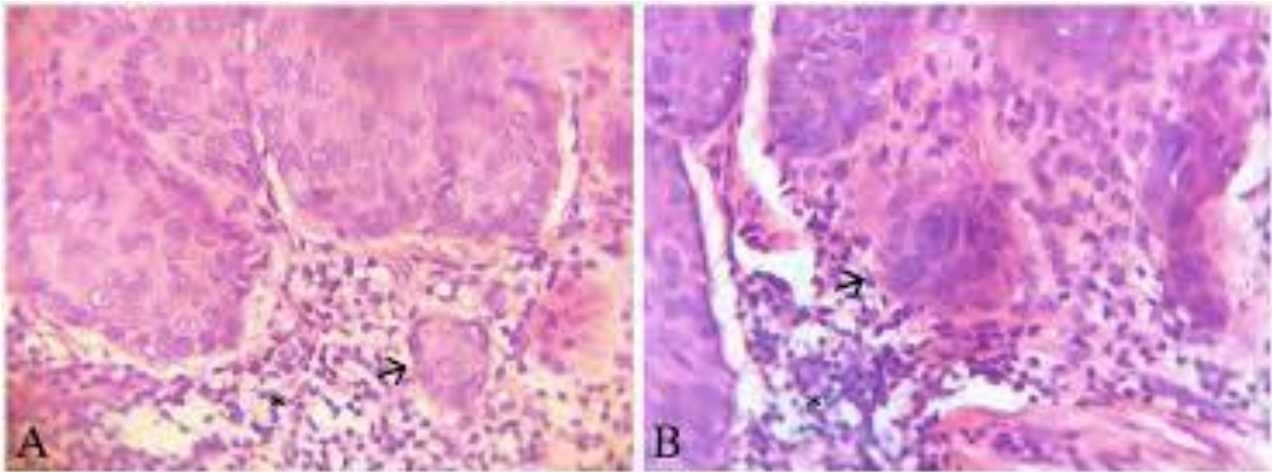
As secções de 5 µm das lesões tumorais e do tecido oral normal de todos os animais de cada grupo experimental utilizadas para as análises histopatológicas, também foram utilizadas para as análises imunoistoquímicas. A detecção dos antígenos bem com a recuperação antigênica será feita por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6,0) a 100°C em microondas. Serão utilizados os antígenos: TLR2, TLR4, MyD88, TBK1, IRF-3, IFN- $\gamma$ , IL-6, PD-1/ PDL-1, CTLA-4, CX3CR1, iNOS, CD163, FOXP3, RANK, RANKL, MAO-A e MAO-B, localizados através dos anticorpos primários específicos,

Para avaliar a intensidade das imunorreações dos antígenos nas lesões tumorais e no tecido oral serão selecionados cinco campos com aumento de 400x para cada animal e cada anticorpo. Os resultados das imunomarcações estão sendo analisados com o auxílio do *software Image J* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) em Análise de Perfil Macro a partir da quantificação das células positivas [8].

## RESULTADOS

Todas as etapas de acompanhamento do desenvolvimento do projeto foram realizadas com sucesso: busca de artigos científicos em bancos de dados; discussão sobre os elementos constituintes das células não cancerígenas; análise dos mecanismos genéticos básicos do câncer; análise das principais causas do câncer bucal no Brasil e no mundo; análise das características clínicas do câncer bucal; formas de tratamento do CEC (Quimioterapia, radioterapia); características citológicas/histológicas do CEC e princípios básicos das imunoterapias para tratamento do CEC.

As tarefas práticas desde a execução de uma biópsia excisional até a confecção das lâminas histológicas, bem como sua análise, foram realizadas com sucesso. Os resultados preliminares indicaram sucesso na indução do câncer no grupo Grupo Controle+OncoTherad® e no grupo câncer (imagens).



- Fotomicroscopia de cortes histológicos do lábio inferior mostrando detalhe da área central de CEC (seta →) e infiltrado inflamatório crônico (\*) (A e B: Coloração HE 400x).

Ainda estão sendo feitas as reações de imunistoquímicas que permitirá avaliar melhor o resultado dos efeitos do OncoTherad® no tratamento do CEC.

## DISCUSSÃO

Todas as atividades previstas no projeto foram integralmente realizadas. Cada uma das etapas do projeto proporcionou a construção do conhecimento, desde os princípios básicos para a realização de uma pesquisa científica até a análise e compreensão dos resultados obtidos com as lâminas histológicas. Vale destacar que após a leitura dos artigos científicos as reuniões semanais a discussão dos temas estabelecidos no projeto permitiram nosso melhor engajamento e para o desenvolvimento do estudo.

Os temas abordados desde a introdução à citologia, funções das organelas e suas características, permitiu a compreensão do funcionamento das células do organismo, o que permitiu a compreensão dos mecanismos genéticos básicos para o desenvolvimento do câncer, principais fatores para a causa do câncer no Brasil e no mundo, analisamos as características clínicas do câncer bucal e os locais mais frequentes acometidos pelo Carcinoma Espinocelular (CEC), após a discussão dos temas citados, foi possível obter uma sólida formação e compreensão do entendimento do câncer de boca.

As discussões dos temas subsequentes como o tratamentos convencionais para o câncer, em especial o câncer de boca, permitiu a compreensão dos tratamentos convencionais do câncer como quimioterapia, radioterapia, e a cirurgia. As discussões nos permitiu compreender a dos tratamentos e, desse modo, as vantagens da imunoterapia para o tratamento do (CEC). A realização de uma biópsia de tecido cancerígeno e a o acompanhamento das etapas para a construção da lâmina para a análise do tecido tumoral, nos permitiu entender como todo o processo de diagnóstico do câncer ocorre e, como os resultados iniciais da imunoterapia com OncoTherad® são identificados [4,5]. A observação das lâminas nos permitiu identificar as alterações dos núcleos das células cancerígenas, a intensa atividade citoplasmática dessas células além da intensa atividade de células inflamatórias no tecido cancerígeno.

## CONCLUSÕES

A participação no projeto permitiu a identificação e compreensão dos elementos constituintes das células normais (não cancerígenas) e seu funcionamento; entender os princípios/mecanismos genéticos básicos de formação do câncer; identificar e discutir as principais causas do câncer bucal no Brasil e no mundo; identificar as características clínicas do câncer bucal; identificar os locais mais frequentemente acometidos pelo câncer bucal; discutir as diferentes formas de tratamento do câncer bucal (Quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, cirurgias); realizar biópsia excisional e a construção de lâminas de tecido tumoral para diagnóstico de câncer e analisar; compreender as características citológicas/histológicas do câncer bucal (carcinoma espinocelular - CEC); identificar os resultados preliminares do emprego do OncoTherad® no tratamento de câncer de boca.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries**. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249.
2. Montero PH, Patel SG. **Cancer of the oral cavity**. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015 Jul;24(3):491-508.
3. Reis SK, Socca EAR, De Souza BR, Genaro SC, Durán N, Fávoro WJ. Effects of combined OncoTherad immunotherapy and probiotic supplementation on modulating the chronic inflammatory process in colorectal carcinogenesis. *Tissue & Cell* 2022a, 75, p. 101747. Bais MV. Impact of Epigenetic Regulation on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res*. 2019 Mar;98(3):268-276.
4. Durán N, Dias QC, Fávoro WJ. OncoTherad: A New Nanobiological Response Modifier, its Toxicological and Anticancer Activities. *Journal of physics. Conference series (print)* 2019, 1323, p. 012018.
5. Alonso, JCC; Reis, IB ; Gonçalves, JM; Sasaki, BR De S ; Cintra, AA; Duran, N; Billis, A ; Fávoro, WJ. Oncotherad immunotherapy elicits promising responses in Bacillus Calmette-Guérin-unresponsive non-muscle invasive bladder cancer: Results from phase I/ II study. *Journal of Clinical Oncology* 2020a, 38, p. e17048-e17048
6. Ribeiro DR, Alves AV, dos Santos EP, Padilha FF, Gomes MZ, Rabelo AS, Cardoso JC, Massarioli AP, de Alencar SM, de Albuquerque-Júnior RL. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015 Aug;117(2):85-95.
7. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987, 95:229-49.
8. Sasaki BR de S, Camargo GC de A, Reis IB, Dias QC, Duran N, Fávoro WJ. A potential new therapeutic option for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer: Combination of intravesical oncotherad immunotherapy and platelet rich plasma (PRP). *Journal of Clinical Oncology* 202, 39, p. 461-461,.