

**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Departamento de Patologia**

***Abordagem dos tumores induzidos pelo  
carcinógeno 7,12-dimetilbenzantraceno  
(DMBA) em modelos experimentais***

Rodrigo Nunes Cal



OMS

**10 milhões de novos casos/ano**

**6 milhões de mortes/ano**

Até o ano 2020

**50%**



15 milhões de casos/ano

**INCIDÊNCIA**

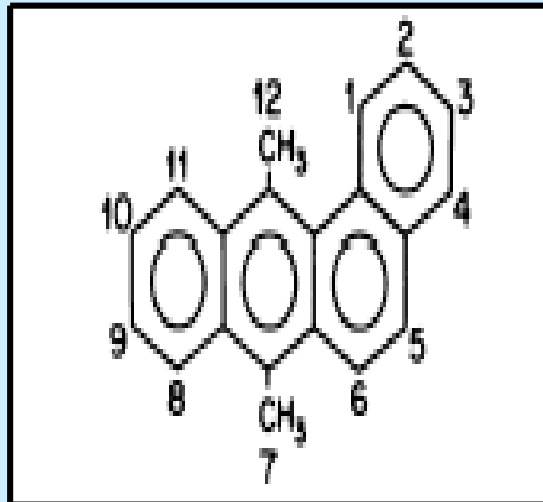
**Quimioprevenção do Câncer**



Uso de uma ou mais substâncias químicas com o objetivo de **inibir**, **retardar** ou **reverter** o processo carcinogênico antes do surgimento do câncer.

# Substâncias Carcinogênicas

- A indução de tumores pelo uso de substâncias carcinogênicas é considerada uma ferramenta experimental essencial para o estudo da carcinogênese, e também, para testes de novas estratégias de prevenção e tratamento.
- Dentre os diversos carcinógenos químicos conhecidos atualmente, o **7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)**, pertencente à família dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, é amplamente utilizado em modelos experimentais.

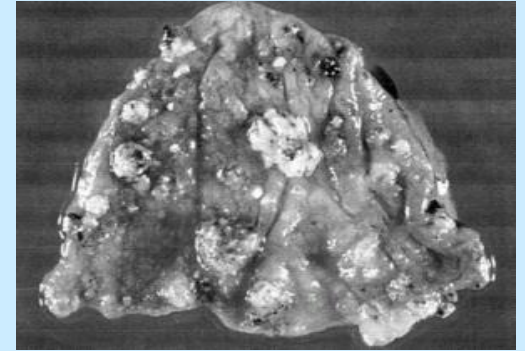
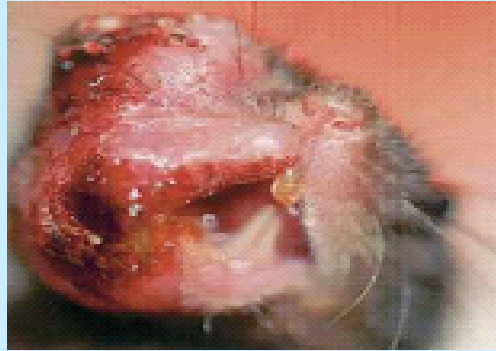


# Aplicações do DMBA na carcinogênese

- ❑ cavidade oral (lábio, língua, bochecha e glândulas salivares)
- ❑ glândulas mamárias
- ❑ pele
- ❑ ovário
- ❑ pâncreas
- ❑ pulmão

## ➤ ESTUDOS:

- Histopatológicos
- Imunohistoquímicos
- Morfológicos
- Morfométricos
- Genéticos
- Bioquímicos
- Fisiológicos



# CARCINOGENESE ORAL

- 1954: demonstração da capacidade do DMBA em induzir carcinoma epidermóide na mucosa de revestimento da bochecha de hamsters sírios dourados.
- Aplicações repetidas de DMBA (0,5%) e acetona na bolsa bucal desses animais produz carcinoma de células escamosas (SCC) histologicamente semelhante àqueles encontrados em humanos, representando um ótimo modelo experimental para induzir lesões orais pré-malignas e SCC.



SALLEY, J.J. *Journal of Dental Research*, 1954.

Lesion Size, mm	Score
<3	1
3-5	2
>5	3

Grade of Dysplasia	Score
None/mild/moderate	1
Severe dysplasia/invasive SCC*	2

\*SCC indicates squamous cell carcinoma.

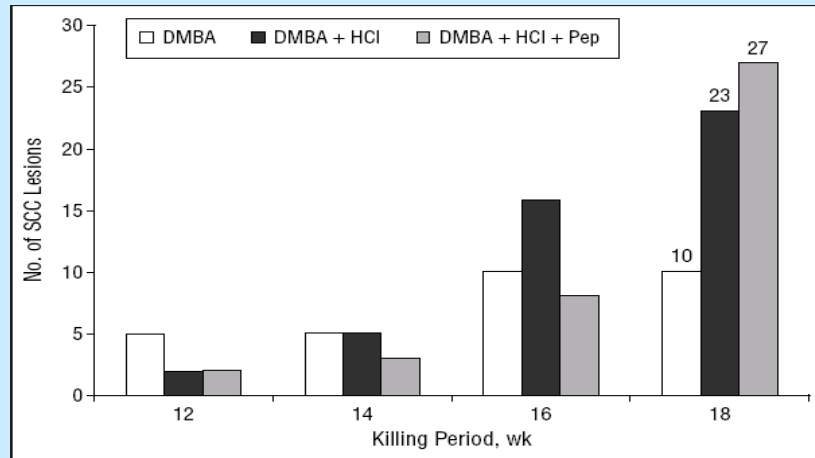


Figure 5. Comparison of tumor number among hamster groups. SCC indicates squamous cell carcinoma; DMBA, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene; HCl, hydrochloric acid; and pep, pepsin.

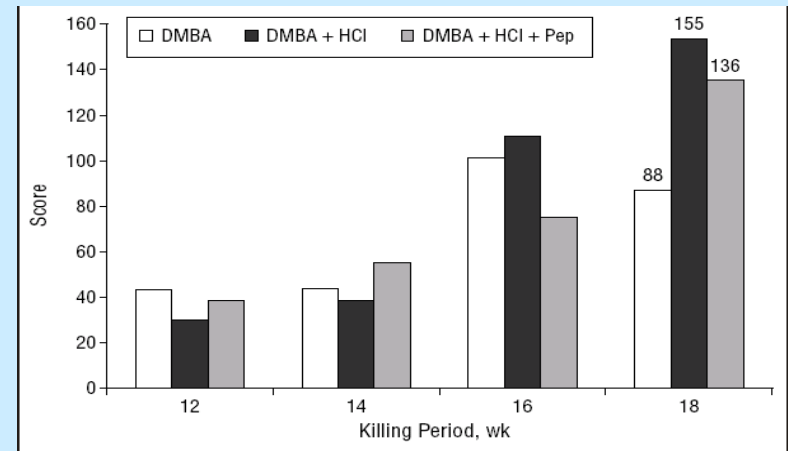


Figure 7. Comparison of dysplasia scores among hamster groups. DMBA indicates 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene; HCl, hydrochloric acid; and pep, pepsin.

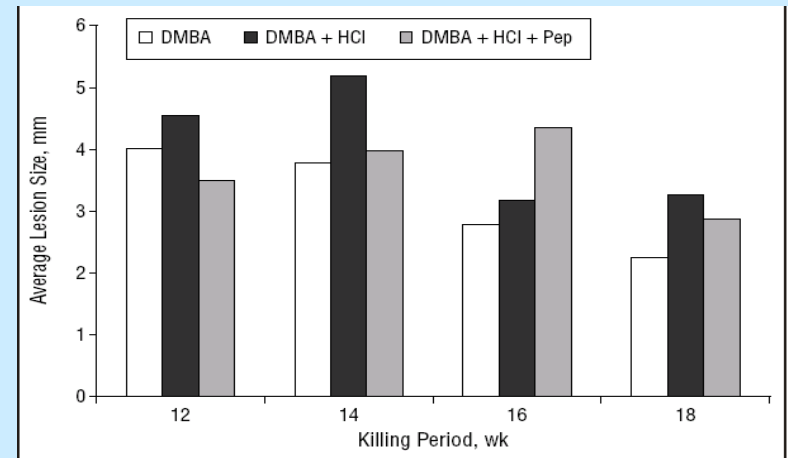


Figure 4. Comparison of average tumor size among hamster groups. DMBA indicates 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene; HCl, hydrochloric acid; and pep, pepsin.

- Agente promotor: ↑ grau de displasia, estimulação da proliferação celular e quantidade dos tumores.

ADAMS, J. *Arch Otol Head Neck Surg.*, 2000.

Table 1

Effects of lycopene on DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis: body weight, tumour incidence and histopathological changes

Group	Treatment <sup>a</sup>	Body weight (g) <sup>b</sup>	Tumour incidence <sup>c</sup>	Keratinosis <sup>d</sup>	Hyperplasia	Dysplasia	Inflammatory exudate	Squamous cell carcinoma
1	DMBA	106 ± 7*	6/6 (100)	+ to +++	+ to +++	+++	-	++++
2	DMBA + lycopene	126 ± 8	0/6 (0)	++	++	+	++	-
3	Lycopene	140 ± 6*	0/6 (0)	-	+	-	-	-
4	Control	120 ± 6	0/6 (0)	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>See Section 2.4 for details on study protocol.<sup>b</sup>Values are mean ± S.D. (*n* = 6); \**P* < 0.05 vs. control (group 4), Student's *t*-test.<sup>c</sup>Percentage of lesions in parentheses.<sup>d</sup> +, mild; ++, moderate; +++, severe; + + + +, well differentiated.

Table 2

Effects of lycopene on DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis: levels of TBARS, GSH and GSH-dependent enzymes in buccal pouch mucosa<sup>a</sup>

Group	Treatment	TBARS <sup>b</sup>	GSH <sup>c</sup>	GPx <sup>d</sup>	GST <sup>e</sup>	GR <sup>f</sup>
1	DMBA	39.52 ± 4.99*	0.30 ± 0.03*	10.24 ± 1.76*	1.42 ± 0.12*	44.34 ± 6.28*
2	DMBA + lycopene	52.78 ± 3.85* <sup>#</sup>	0.43 ± 0.05* <sup>#</sup>	15.6 ± 1.65* <sup>#</sup>	2.17 ± 0.31* <sup>#</sup>	51.62 ± 4.84* <sup>#</sup>
3	Lycopene	69.60 ± 2.25* <sup>#</sup>	0.21 ± 0.04* <sup>#</sup>	8.34 ± 0.93* <sup>#</sup>	0.91 ± 0.16* <sup>#</sup>	33.49 ± 3.98* <sup>#</sup>
4	Control	80.90 ± 4.87	0.14 ± 0.02	6.32 ± 0.42	0.54 ± 0.12	24.13 ± 3.58

<sup>a</sup>See Section 2.4 for details on study protocol. Values are mean ± S.D. (*n* = 6); \**P* < 0.05 vs. group 4, <sup>#</sup>*P* < 0.05 vs. group 1, Duncan's multiple range

■ ↑ Enzimas antioxidantes ➡ ↓ efeito carcinogênico do DMBA

BHUVANESWARI, V. *Fitoterapia*, 2001.

- O estudo da carcinogênese induzida em glândulas salivares tem como agente mais utilizado o DMBA, podendo ser implantado na forma de *pellet* ou injetado na forma de solução em diferentes veículos após procedimento cirúrgico.
- A única injeção da solução de DMBA e vaselina na glândula submandibular de ratos Sprague-Dawley induziu carcinoma de células escamosas.

**TABLE**  
**DOSES AND TUMOR INCIDENCE**

Group	No. of Animals	ml	Carcinogen % Solution	μg	Animals With Tumors	% Tumors
1	9	0.025	1.0	250	4	45
2	11	0.05	1.0	500	5	45
3	10	0.05	1.5	750	4	40
4	11	0.05	2.0	1000	11	100
5	8	0.05×2	0.5×2	250×2	3	38

SCHMUTZ, J.A. *Journal of Dental Research*, 1969.



**Table 6** Tumors induced in rat submandibular glands which received duplicate DMBA injection

Animals	Adenocarcinoma	Squamous cell carcinoma	Sarcoma
<b>Males<sup>a</sup></b>			
7E12Bi1	—	—	+
7E12Bi2	—	—	+
7E12Bri1	—	—	+
7E12Bri2	—	—	+
7E22Wi	—	—	+
7E22Bi2	—	+	+
7E22Bi3	—	—	+
8E12Bi1	—	+	+
8E12Bi2	—	—	+
8E12Bi4	—	—	+
8E12Bi5 <sup>b</sup>	—	+	+
<b>Females<sup>a</sup></b>			
7E12Ri1	+	—	+
7E12Ri2	+	+	+
7E12Ri3	—	—	+
7E12Bli1	+	—	+
7E12Bi3	—	—	+
7E22Ri1	—	—	+
8E12Ri1	+	+	+
8E12Ri2	—	—	+
8E12Ri3 <sup>b</sup>	—	+	+
8E12Ri4	+	—	+
8E12Ri5	+	—	+
<b>Males<sup>c</sup></b>			
9E22Ba1	—	+	+
9E22Ba2	—	—	+
9E22Ba3 <sup>b</sup>	—	—	+
9E22Ba4	—	—	+
9E22Ba5	—	—	+
<b>Females<sup>c</sup></b>			
9E22Ra1	—	—	+
9E22Ra2	—	—	+
9E22Ra3	—	—	+
9E22Ra4	—	—	+
9E22Ra5	—	+	+

<sup>a</sup> Animals were 10 days old at the time of the first DMBA injection

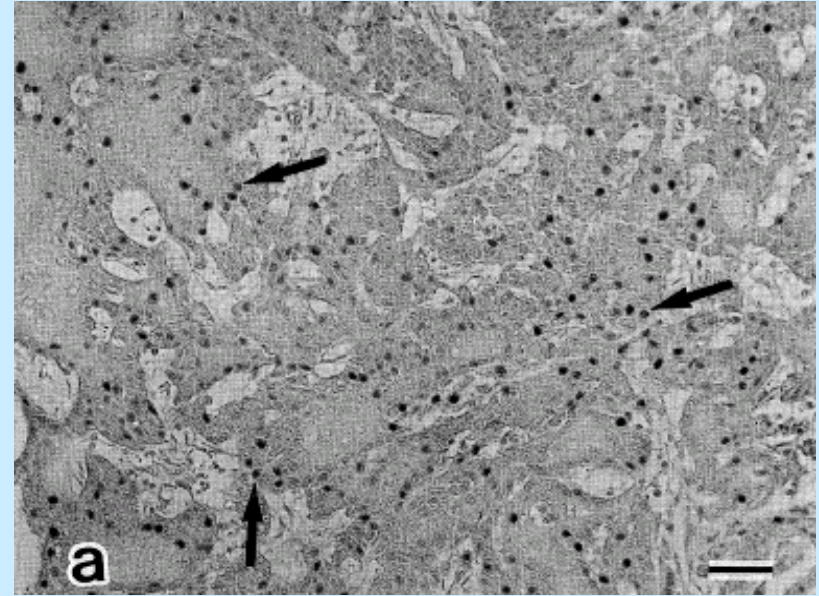
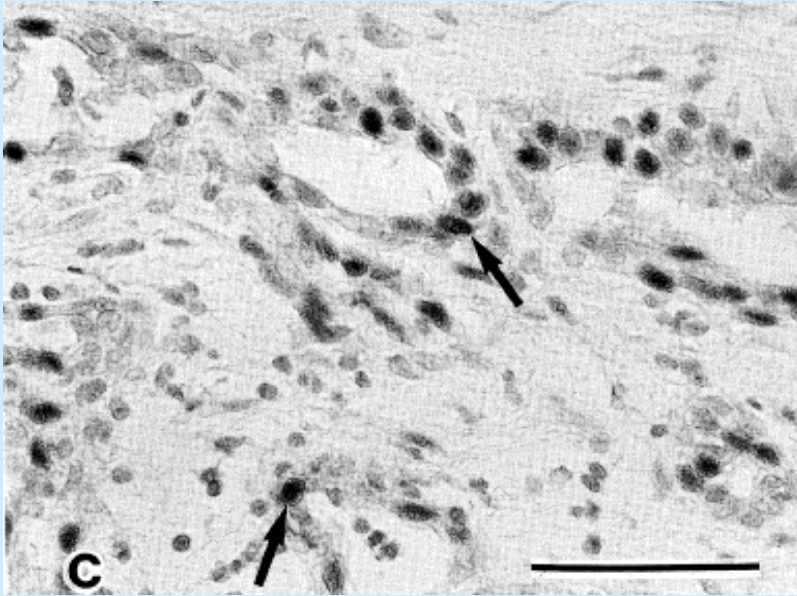
<sup>b</sup> Animals expressed metastatic foci of sarcoma in the lungs

<sup>c</sup> Animals were 8 weeks old at the time of the first DMBA injection

- A dupla injeção da solução de DMBA (1%) e acetona (0,05ml/130g) na glândula submandibular de ratas Wistar recém-nascidas induziu adenocarcinoma contendo células mioepiteliais.

OGAWA, Y. *Virchows Arch.*, 2000.

- A implantação de pellet de DMBA (10mg) na glândula submandibular de ratas Fisher induziu carcinoma epidermóide.



- A presença do receptor de estrógeno no núcleo de células ductais das glândulas normais dos animais e no núcleo das células neoplásicas mais periféricas do tumor sugere um envolvimento dos estrógenos nas funções das células ductais e no desenvolvimento dos tumores da glândula submandibular.

# CARCINOGENESE MAMÁRIA

- 1961: demonstração da rápida indução de múltiplos tumores mamários em ratas pela administração de uma única dose de DMBA por gavagem intragástrica. Atualmente, diversas doses únicas de DMBA têm sido aplicadas em ratas para estudar a eficácia da indução de tumores mamários.

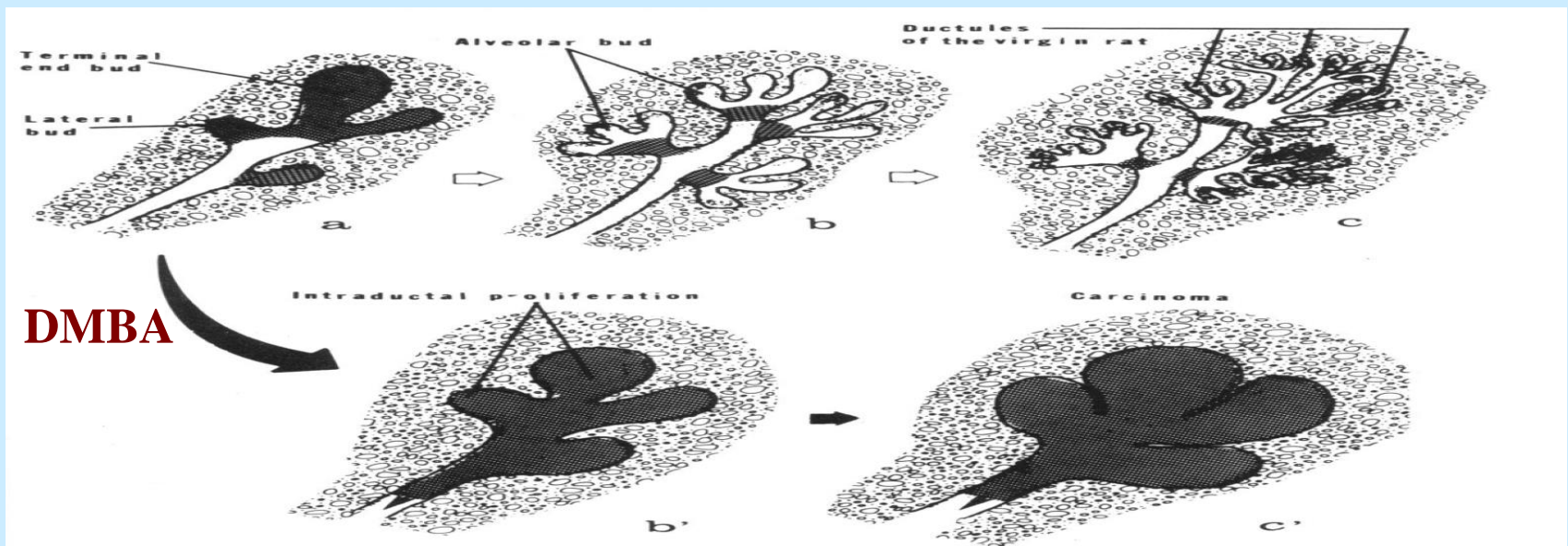
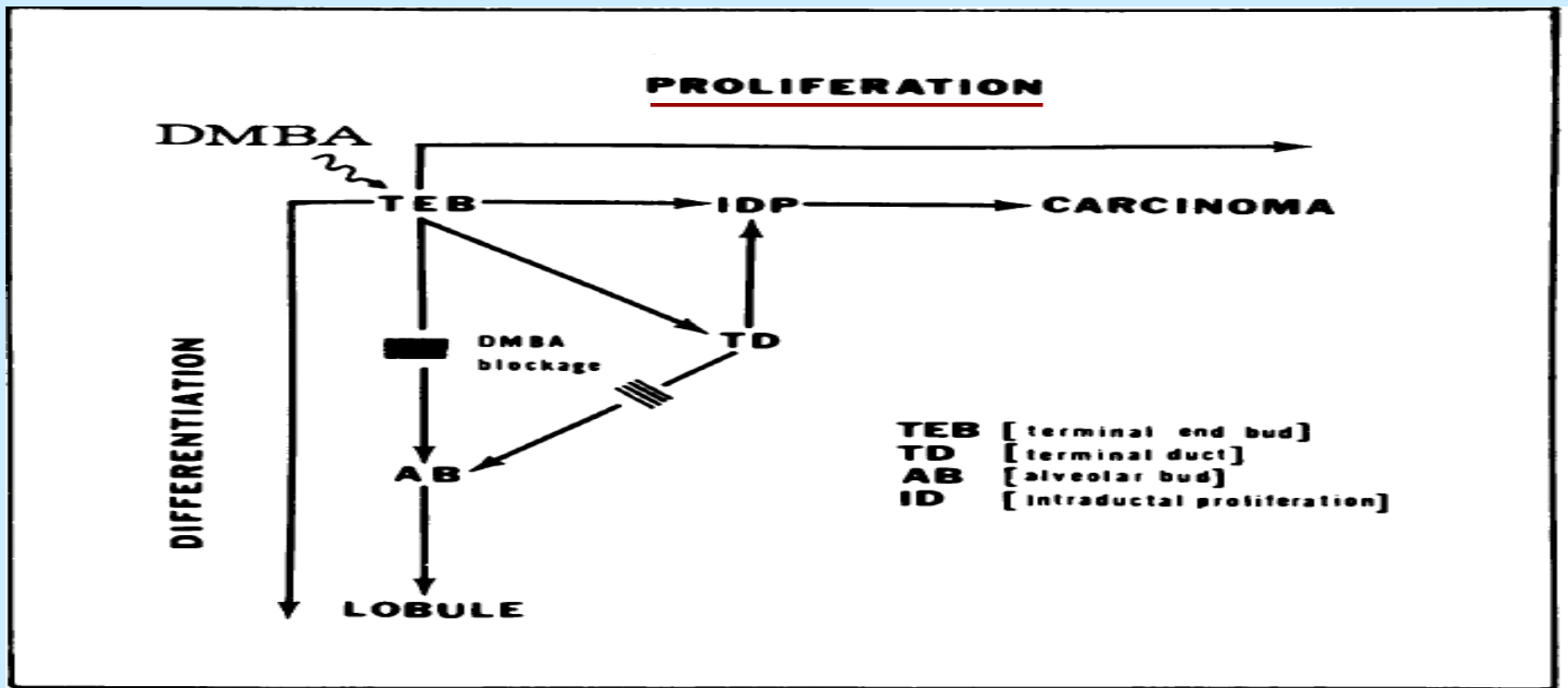


FIGURE 1. Postnatal development of the rat mammary gland and site of origin of DMBA-induced mammary carcinoma: (a) terminal end buds at 50 days of age; (b) TEBS differentiated into alveolar buds; (c) alveolar buds differentiated in the small ductules of the virgin lobules; (b') intraductal proliferation originated from TEB after DMBA treatment; (c') microtumor.

HUGGINS, C. *Nature*, 1961.

- Os carcinomas mamários induzidos pela administração de DMBA em ratas virgens e jovens surgem de estruturas ductais terminais indiferenciadas (TEBs). Os TEBs normalmente diferenciam-se em alvéolos, mas sob a influência do DMBA, as células ductais proliferam-se até o surgimento do carcinoma.



**FIGURE 2.** Schematic representation of the effects of DMBA on cellular differentiation and proliferation. TEB, terminal end bud; TD, terminal duct; AB, alveolar bud; ID, intraductal proliferation.

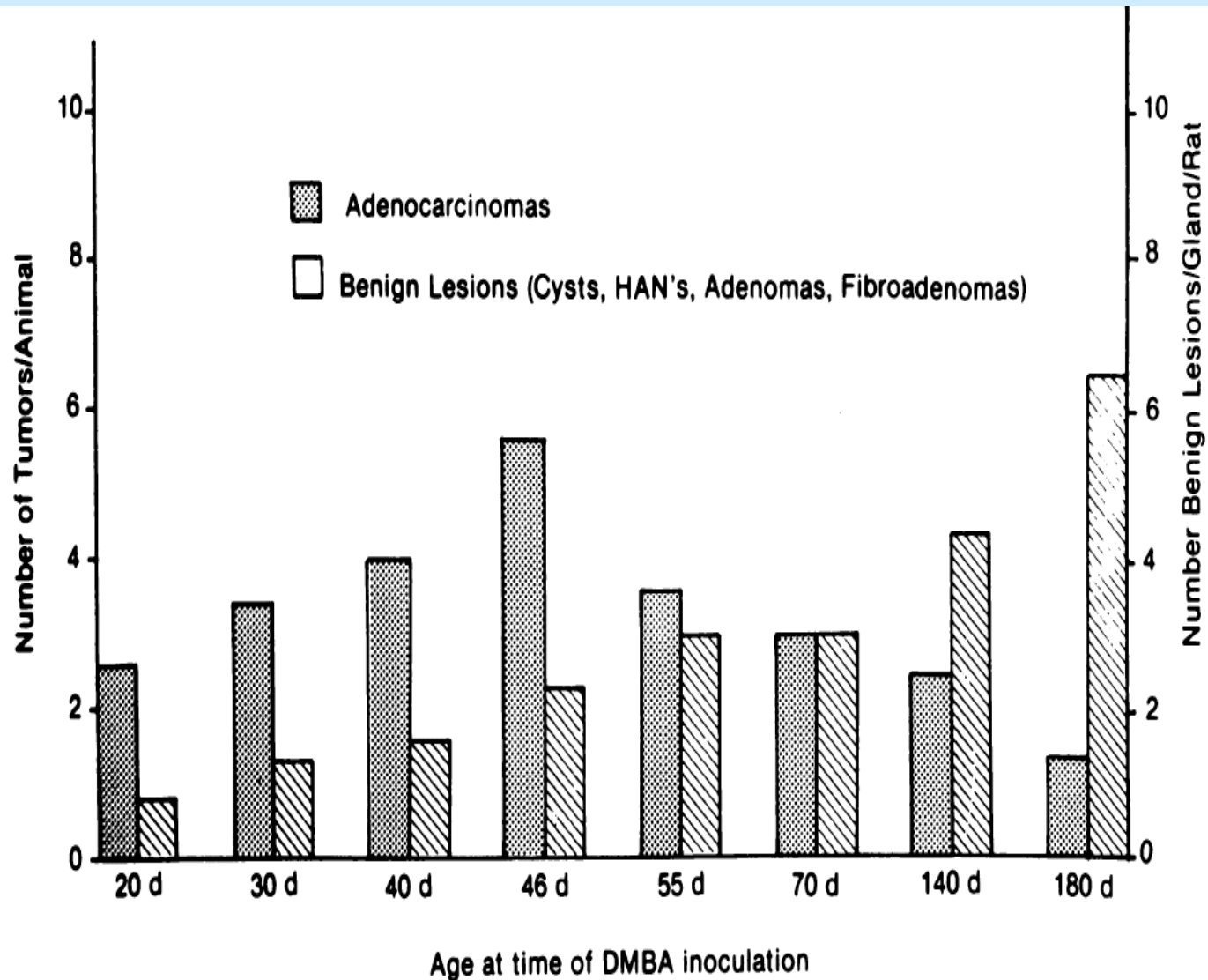
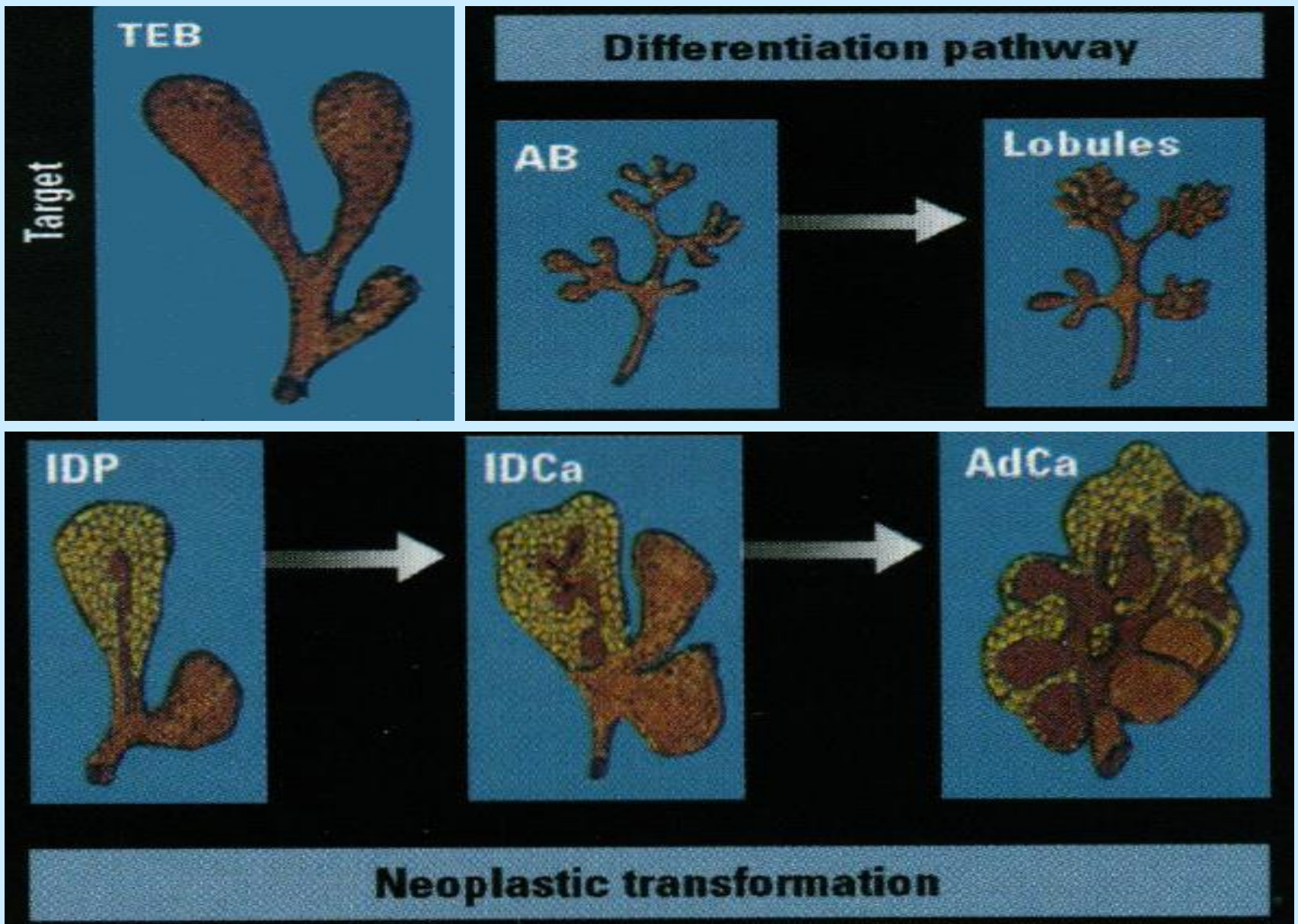
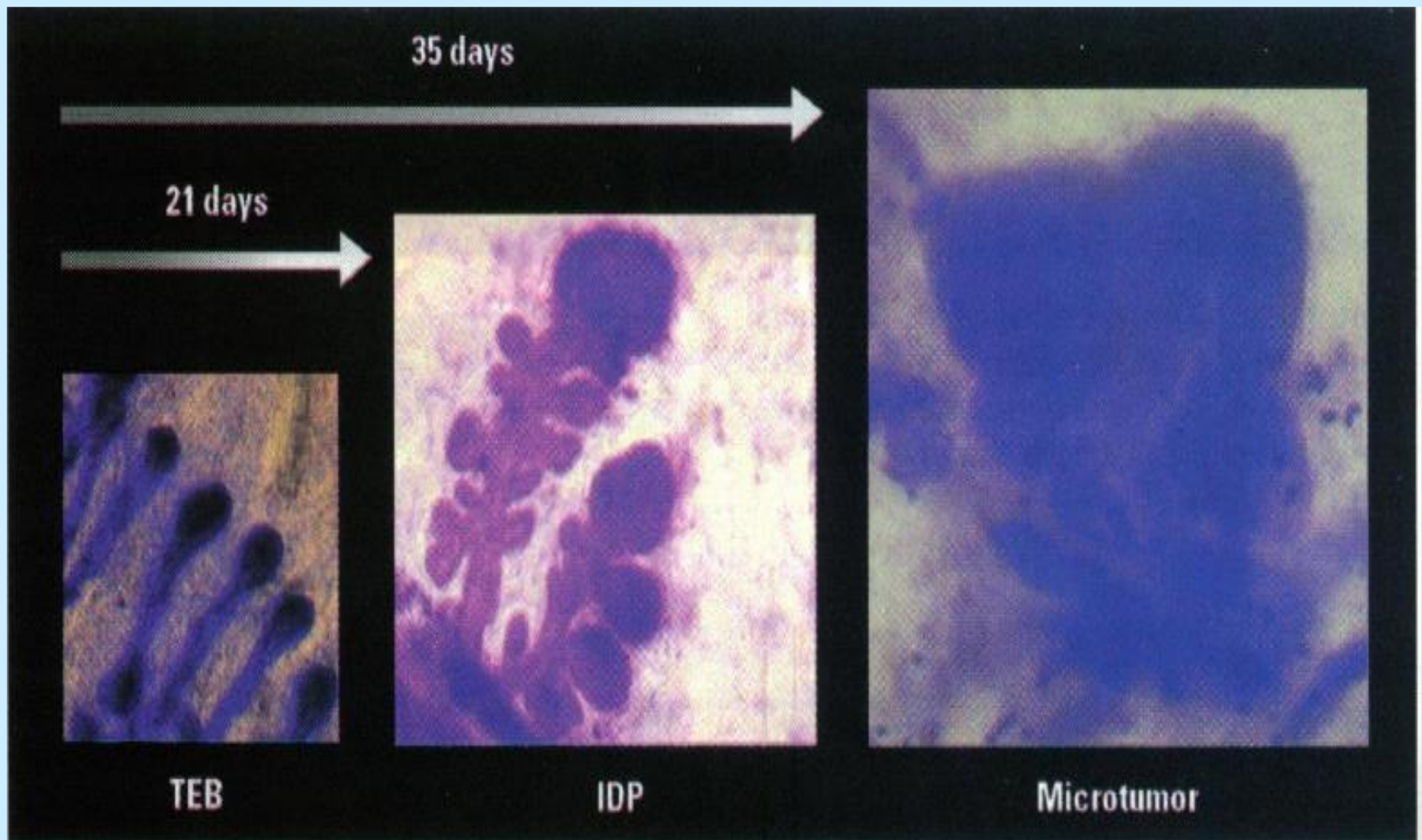


FIGURE 5. Incidence of adenocarcinomas and benign lesions in Sprague-Dawley rats treated at different ages with DMBA. Adapted from Russo, Wilgus and Russo (102) with permission of the editor.

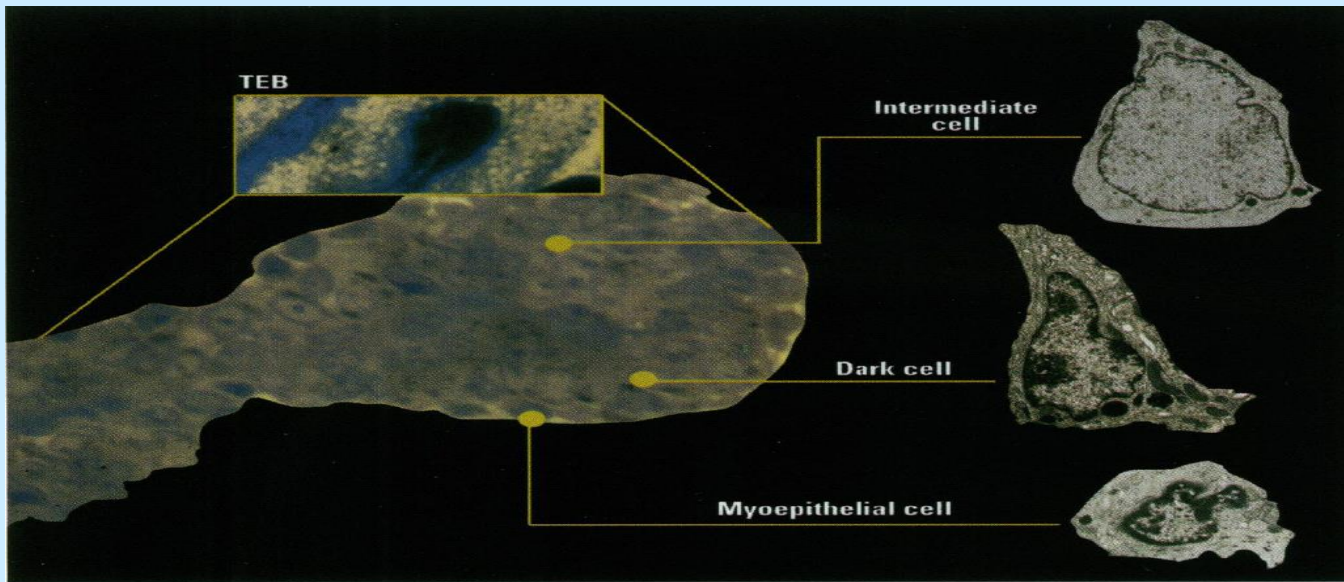
RUSSO, J. *Environmental Health Perspectives*, 1983.



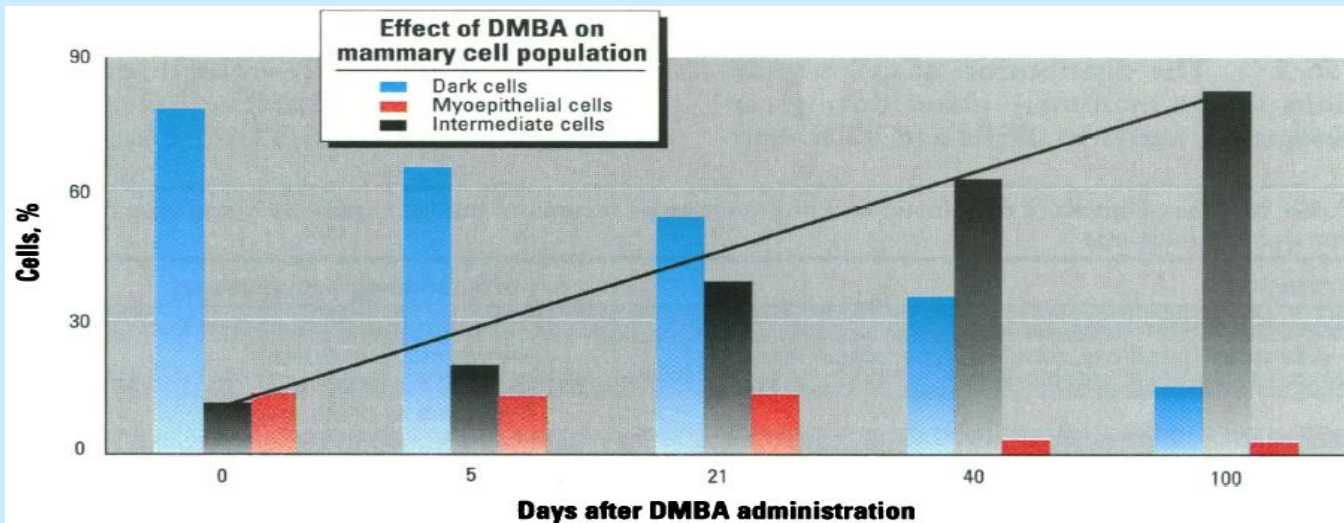
RUSSO, I.H. *Environmental Health Perspectives*, 1996.



**Figure 10.** Terminal end buds (TEB;  $\times 77$ ) located in Zone C of the mammary gland of a 55 day-old virgin rat become enlarged and darkly stained by 21 days post-DMBA administration; they are called intraductal proliferations (IDP;  $\times 79$ ), which by 35 days post-treatment grow and coalesce to form microtumors that are not palpable ( $\times 129$ ). Whole mount preparations, toluidine blue.



**Figure 5.** Composite showing the terminal end bud (TEB) of the virgin rat mammary gland in whole mount ( $\times 50$ ), longitudinal section of a plastic embedded TEB stained with toluidine blue (center,  $\times 1395$ ); electron micrograph of intermediate ( $\times 3575$ ), dark ( $\times 7125$ ), and myoepithelial cells ( $\times 7500$ ). Uranyl acetate-lead citrate.



**Figure 14.** Effect of DMBA on mammary epithelial cell population. Dark cells, which predominate in the normal mammary gland ducts, become progressively replaced by intermediate cells. A slight reduction in number of myoepithelial cells is observed between 40 and 100 days post-DMBA administration.



# CARCINOGENESE CUTÂNEA

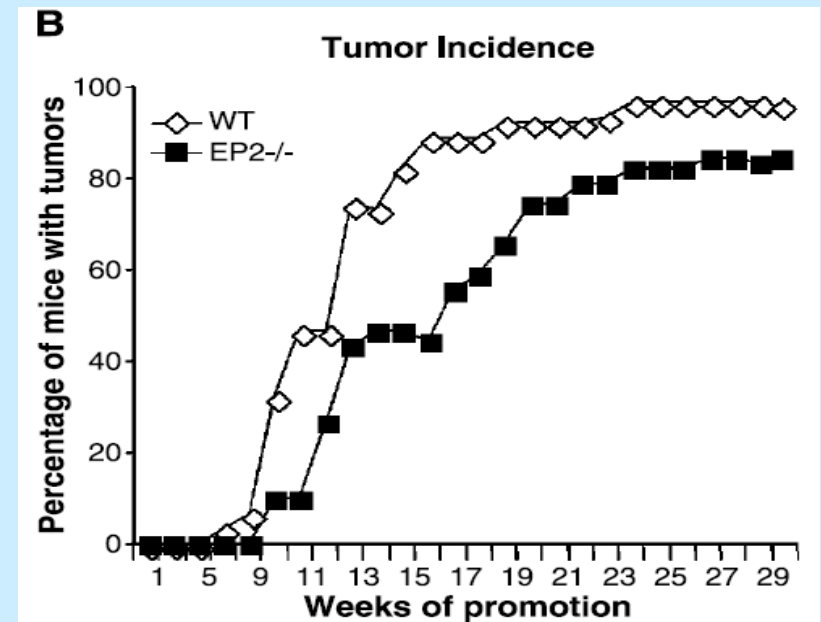
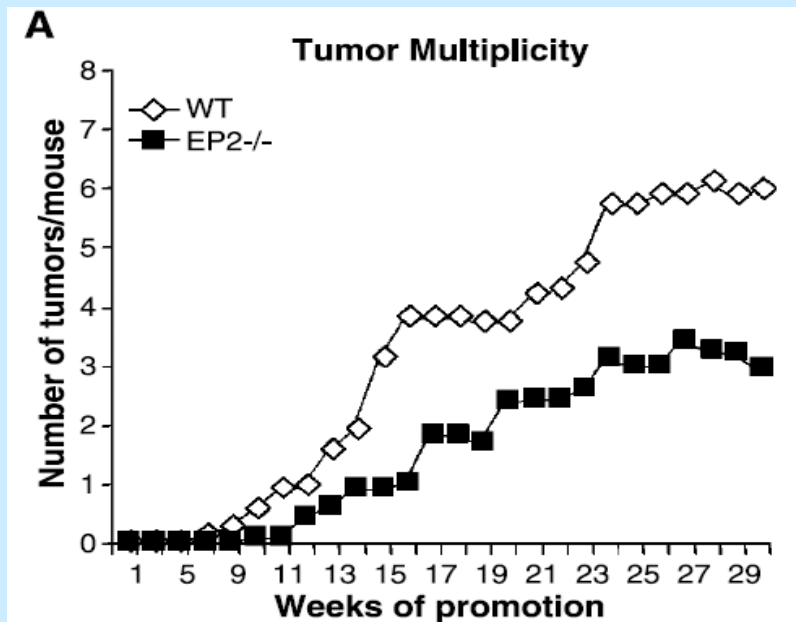
- O acetato de tetradecanoilforbol (TPA) é um agente promotor amplamente utilizado para induzir tumores na pele de ratos e camundongos.
- Diferentes doses únicas de DMBA e acetona (100µl) foram aplicadas após a raspagem da pele na região dorsal de camundongos transgênicos (ausência na síntese da proteína metalotioneína) e normais.

**Table 1** *Mouse skin tumor caused by a single topical application of DMBA for 14 weeks*

DMBA (µg)	Incidence of skin tumor	
	MT (+/+) mice	MT (-/-) mice
0	0/10	0/10
100	0/10	0/10
250	0/10	2/10
500	0/10	4/10 <sup>a</sup>
1000	0/10	7/10 <sup>b</sup>

ZHANG, B. *Cancer Research*, 1998.

- 100 $\mu$ g de DMBA em 200 $\mu$ l de acetona foi aplicado topicamente após a raspagem da pele na região dorsal de camundongos fêmeas transgênicos (ausência da síntese do receptor EP2 da prostaglandina E2) e normais.
- Duas semanas após a iniciação, os animais foram tratados com 2,5 $\mu$ g de TPA em 200 $\mu$ l de acetona (2 vezes por semana durante 30 semanas).



- Estudos têm demonstrado que o ácido asiático (encontrado na planta *Centella asiatica*) possui efeitos benéficos no organismo, dentre eles, a capacidade de induzir apoptose nas células cancerosas de vários tecidos.

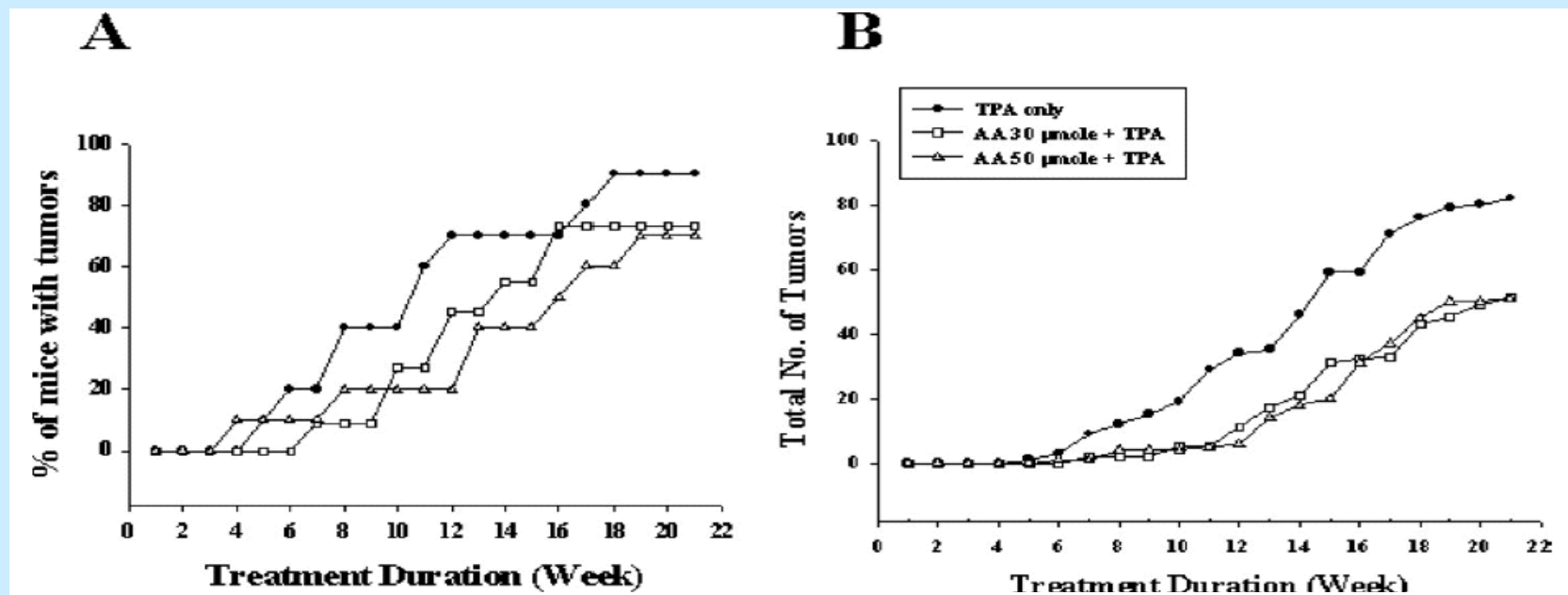


Fig. 1. Preventive Effects of Asiatic Acid on DMBA-Initiated and TPA-Promoted Mouse Skin Tumorigenesis

All the groups of mice were treated on the backs with a single topical application of DMBA (40 μg), and then, TPA (5 μg) twice a week for 15 weeks. Asiatic acid (30 or 50 μmol) and acetone as a vehicle were applied 1 h prior to every application of TPA for the experimental groups and control group, respectively. AA, DMBA, and TPA represent asiatic acid, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, and 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate, respectively.

# CARCINOGENESE PANCREÁTICA

- A implantação de DMBA (1g) na cabeça do pâncreas de camundongos machos induziu adenocarcinoma e neoplasias pancreáticas intraepiteliais nos animais de todos os grupos.

TABLE 1 - Characterization of the experimental groups

Group	Pancreas	Pre-operative <sup>1</sup>	Post-operative <sup>1</sup>
Water	DMBA	Water	Water
Alcohol	DMBA	Alcohol	Alcohol
Caffeine	DMBA	Caffeine	Caffeine
Alcohol + caffeine	DMBA	Alcohol + caffeine	Alcohol + caffeine

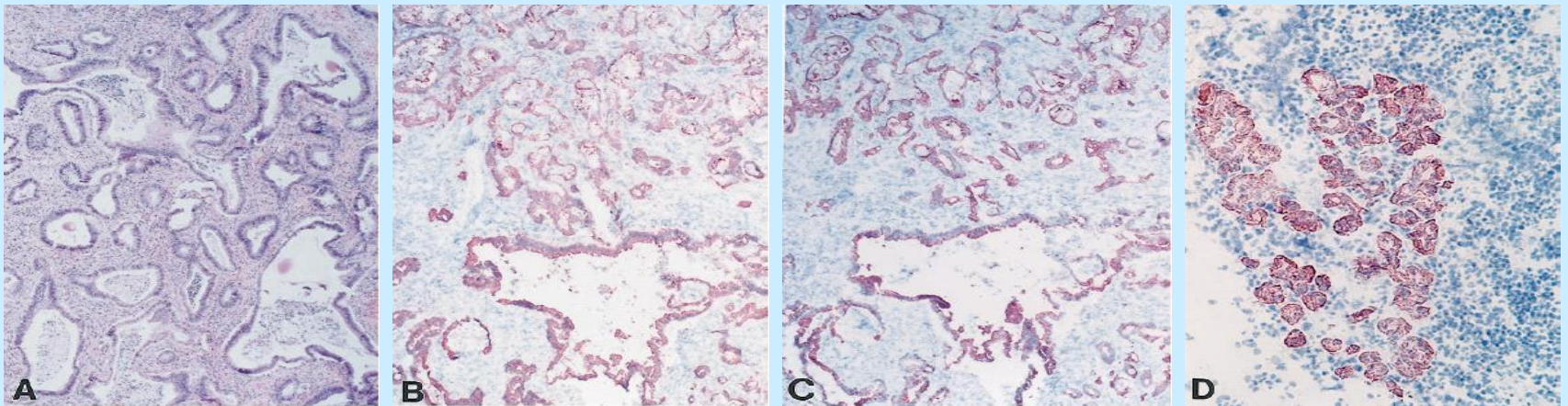
<sup>1</sup>Pre- and post-operative periods each of 30 days' duration

TABLE 3 - Frequency of histological diagnoses in the different groups

	<i>n</i>	Normal	Reactive hyperplasia	Ia	Ib	PanIN II	III	Invasive carcinoma
DMBA + water	24	0	4	1	4	8	3	4 (16.6%)
<u>DMBA + alcohol</u>	17	1	1	0	1	3	2	9 (52.9%) <sup>a</sup>
DMBA + caffeine	20	3	1	1	4	4	4	3 (15%)
DMBA + alcohol + caffeine	21	1	0	1	2	10	2	5 (23.8%)

*P*<0.05 (Fisher exact Test)

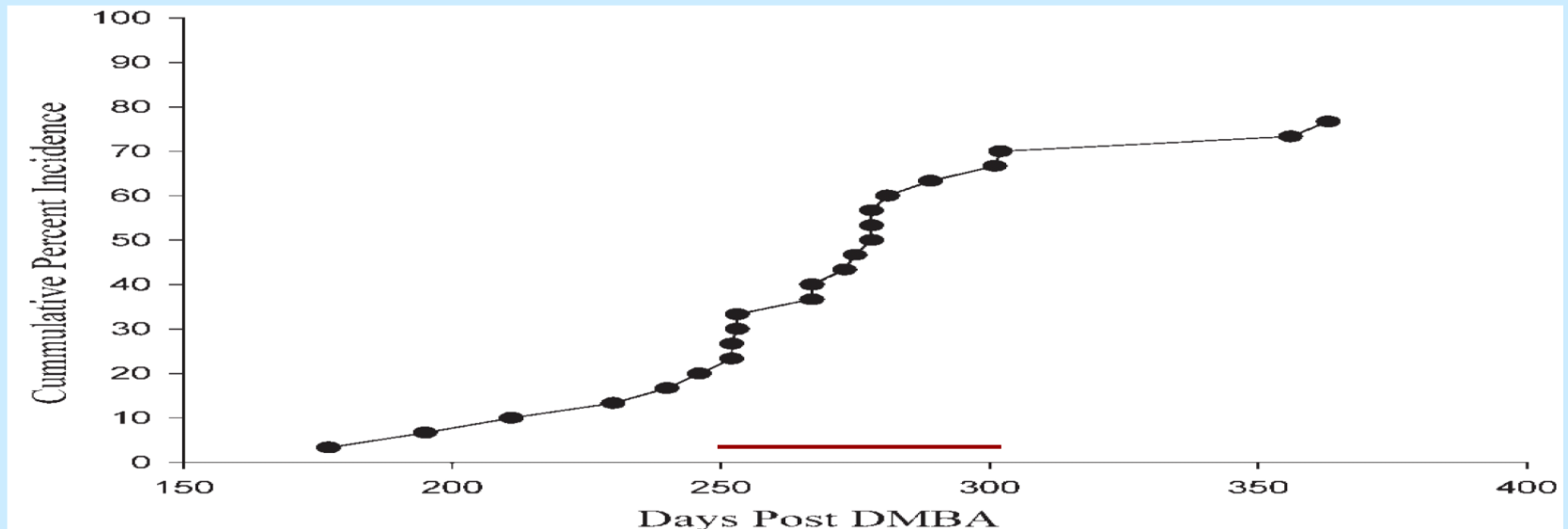
- Implantação de DMBA (5mg) na cabeça do pâncreas de ratos Sprague-Dawley. O sacrifício dos animais de cada grupo ocorreu em 1, 2 ou 9 meses após o procedimento cirúrgico.
- As lesões pré-neoplásicas e os adenocarcinomas apresentaram um padrão de expressão dos marcadores imunohistoquímicos similar àqueles encontrados em humanos, sugerindo que a transformação das células ductais é essencial para o surgimento dos tumores.



**Figure 1.** Ductal cell markers in DMBA-induced rat pancreatic neoplasms. **A:** Adenocarcinoma (hematoxylin and eosin stain, paraffin section, original magnification,  $\times 100$ ). **B:** Adenocarcinoma, cytokeratin 19 (cryostat section, ABC reaction, original magnification,  $\times 100$ ). **C:** Adenocarcinoma, same tumor as in **B** now stained for cytokeratin 20 (cryostat section, ABC reaction, original magnification,  $\times 100$ ). **D:** Tubular complex at 1 month, cytokeratin 19 (cryostat section, ABC reaction, original magnification,  $\times 200$ ).

# CARCINOGENESE OVARIANA

- 200µg de DMBA foi implantado no ovário esquerdo de ratas Wistar-Furth. Após 12 meses, os animais foram sacrificados.
- 77% dos animais (23/30) apresentaram tumores, sendo estes classificados em adenocarcinoma bem diferenciado (1), adenocarcinoma pouco diferenciado (8), células tumorais da teca e da granulosa (8) e sarcomas não diferenciados (6).



**Fig. 1.** Cumulative incidence of ovarian tumors from the date of suture implantation to the time of palpation or discovery at termination of the experiment. DMBA-coated suture was implanted at 7 weeks of age.

- A aplicação de DMBA (2,5 ou 5µg) no ovário de ratas Sprague-Dawley induziu lesões semelhantes às encontradas em humanos. Após 2 meses, os animais de um dos grupos foram submetidos a um tratamento hormonal de gonadotrofina, causando um aumento da severidade das lesões.
- Observação de uma superexpressão dos receptores de estrógeno e progesterona nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas.
- Mutações pontuais nos genes Tp53 e Ki-ras foram detectadas, sendo também características dos carcinomas humanos.

Table 1 *Incidence and severity of DMBA-induced ovarian lesions*

Severity of lesions	Arm 1	Arm 2	Arm 3	Control ovaries			Total ovaries
	DMBA (2.5 µg)	DMBA (5.0 µg)	DMBA (5.0 µg)+hormone	Arm 1	Arm 2	Arm 3	
No lesions cnt. (%)	35 (59.32)	12 (40.00)	14 (48.28)	52 (88.13)	23 (76.67)	21 (72.41)	157 (66.52)
Nonneoplastic lesions cnt. (%) *	11 (18.64)	5 (16.66)	1 (3.45)	5 (8.47)	4 (13.33)	2 (6.89)	28 (11.86)
Putative preneoplastic lesions cnt. (%) †	12 (20.34)	13 (43.33)	11 (37.93)	2 (3.38)	2 (6.67)	6 (20.69)	46 (19.49)
Neoplastic lesions cnt. (%)	1 (1.69)	0 (0.00)	⇒ 3 (10.34)	0	1 (3.33)	0	5 (2.12)
Total animals/Total ovaries cnt. (%)	59 (25.00)	30 (12.71)	29 (12.29)	59 (25.00)	30 (12.71)	29 (12.29)	236 (100)

\* Chronic inflammation; foreign body granuloma; prominent corpora lutea; suture granuloma; salpingitis.

† Epithelial hyperplastic lesions: ovarian surface epithelium or bursal flat hyperplasia (either pseudostratification or real stratified hyperplasia); ovarian surface epithelium or bursal papillae or papillomatosis; inclusion cysts; endosalpingiosis. All these lesions can present with or without atypia.

Abbreviation: cnt., number of lesions, ovaries, or animals.

# CARCINOGENESE PULMONAR

- Estudos demonstraram que a administração intratraqueal de DMBA induziu tumores pulmonares em camundongos.
- O DMBA (10mg/kg) foi injetado subcutaneamente em camundongos neonatais machos e fêmeas, e logo em seguida, estes foram expostos à baixa temperatura (0/-1°C por 2h em dias alternados durante 3 meses).
- Após 4 meses, 53,3% dos machos e 30,3% das fêmeas apresentaram tumores pulmonares. Entretanto, 81,1% de animais não estressados que receberam a mesma dose de DMBA desenvolveram tumores.



YOMAMOTO, H. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 1995.

PYLEV, L.N. *Biull Eksp Biol Med.*, 1961.

WALTERS, M.A. *British Journal of Cancer*, 1966.

FLAKS, A. *British Journal of Cancer*, 1967.

SELLAKUMAR, A. *Cancer Res Clin Oncol.*, 1974.



