



Universidade Federal do Maranhão
**Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa, Pós-
Graduação e Internacionalização**
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE
CÂNCER DE PÊNIS HPV NEGATIVO: POTENCIAL EFEITO
DO TRATAMENTO CRÔNICO COM COMPOSTO ISOLADO
DA *SCOPARIA DULCIS L.***

LARISSA SOUSA RIBEIRO

São Luís

2023

LARISSA SOUSA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE
CÂNCER DE PÊNIS HPV NEGATIVO: POTENCIAL EFEITO
DO TRATAMENTO CRÔNICO COM COMPOSTO ISOLADO
DA *SCOPARIA DULCIS L.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de concentração: Processos biológicos em Saúde

Linha de Pesquisa: Doenças infecciosas e endêmicas no Maranhão

Orientador: Prof. Dr. Natalino Salgado Filho

Co-orientador: Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito

São Luís

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ribeiro, Larissa Sousa.

Desenvolvimento de um modelo animal de câncer de pênis HPV negativo: potencial efeito do tratamento crônico com composto isolado da *Scoparia Dulcis* L / Larissa Sousa Ribeiro. - 2023.

79 p.

Coorientador(a): Haissa Oliveira Brito.

Orientador(a): Natalino Salgado Filho.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. 4NQO. 2. Câncer de pênis. 3. Carragenina. 4. Cirsitakaosideo. 5. HPV negativo. I. Brito, Haissa Oliveira. II. Filho, Natalino Salgado. III. Título.

LARISSA SOUSA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE
CÂNCER DE PÊNIS HPV NEGATIVO: POTENCIAL EFEITO
DO TRATAMENTO CRÔNICO COM COMPOSTO ISOLADO
DA *SCOPARIA DULCIS L.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____ / ____ / ____ .

Prof. Dr. Natalino Salgado Filho (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Haissa Oliveira Brito (Co-orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. João Victor Leal Salgado (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Bernadete Jorge Leal Salgado (Examinador Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

*Dedico aos meus pais e ao meu amado esposo
pelo incentivo constante durante toda essa jornada*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu bom Deus pela benção da aprovação nesse mestrado, por todo suprimento durante o percurso e por me conceder a vitória de chegar até aqui. Toda honra e glória seja dada ao Senhor.

Aos meus pais, por todo amor, incentivo e torcida em tudo que faço. Sem vocês não conseguiria chegar a lugar algum. Ao meu irmão, por todo amor e carinho que sempre tivemos um pelo outro.

Ao meu amado esposo, Murilo, por nunca soltar minha mão. Por sonhar comigo cada sonho, acalantar cada choro e me estender a mão quando pensei que não pudesse ir mais longe. Por toda paciência, cuidado e amor. Te amo e te amarei sempre.

À minha amada avó Ivone, por sempre torcer por mim, e minha tia Vânia e prima Valéria por estarem vibrando em cada conquista minha e por todos os conselhos,

Aos meus sogros, Osana e Murilo, por toda torcida em tudo que faço.

Ao meu orientador, o professor Dr Natalino Salgado, por toda confiança depositada em mim durante esses dois anos de pesquisa. Deus o abençoe ricamente. Agradeço, em especial, a professora Haissa e o professor Rui, por todo cuidado e ensinamentos durante cada etapa do programa de mestrado. Que Deus abençoe cada passo de vocês.

Agradeço imensamente à professora Cláudia por ceder as amostras de Ciscitakoideo para execução deste projeto, bem como ajudar em todos os processos que foram necessários.

Aos meus amigos e parceiros que tanto me ajudaram nessa caminhada, Camila, Marina e Fabrício. Sem a preciosa ajuda de vocês esse trabalho não poderia ser executado. Vocês são anjos em minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto e seus coordenadores por toda ajuda e suprimento durante esse percurso, em especial a Professora Socorro Cartágenes por todo auxílio.

Ao Laboratório de Farmacologia pela estrutura cedida, em especial Elaine, que tanto nos ajudou nos processos bioquímicos e auxiliou em cada etapa.

A todos os servidores que ao fazerem seus trabalhos, tornaram o ambiente propício para a execução desse trabalho.

Aos animais que foram sacrificados para em prol desse lindo trabalho. Que tudo isso seja um sopro de esperança para salvar vidas e contribuir para nossa ciência e conhecimento. Agradeço também aos funcionários do Biotério Central, em especial a pessoa do Professor Raphael, pelo empenho e excelente trabalho exercido.

Agradeço a todos em geral, que direta ou indiretamente, contribuíram para que tudo isso acontecesse.

Soli Deo Glória.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: O câncer de pênis é um grave problema de saúde pública no Norte e Nordeste do Brasil. A atual classificação da Organização Mundial de Saúde considera existirem duas vias de carcinogênese peniana, uma associada ao papilomavírus humano (HPV) e outra, menos bem caracterizada, independente do HPV, a qual especula-se ser induzida por inflamação crônica. Ademais, são poucas as opções de tratamento para diminuição das lesões nesse contexto. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo de carcinogênese peniana independente do HPV, testando a hipótese de que a inflamação crônica induz câncer de pênis e avaliação do potencial efeito do tratamento com o composto isolado Cirsitakaosideo (Cirsimarina).

Métodos: Foram utilizados quarenta ratos machos da espécie Wistar com 8 semanas de idade os quais foram divididos em 6 grupos experimentais, expostos topicamente na glândula do pênis a salina (Grupo controle), a um agente inflamatório (carragenina, CG), um agente mutagênico (4-nitroquinolina, 4NQO) e a ambos os produtos. Dois grupos expostos à CG e 4NQO receberam ainda um composto natural com propriedades anti-inflamatórias, cirsimarina (0,5mg/Kg e 1,0mg/Kg). O tratamento foi realizado durante 12 semanas. O aspecto macroscópico do pênis e a temperatura da região pélvica foram avaliados através de técnicas fotográficas e termográficas. Foram coletados os órgãos seguintes: pênis, língua, coração, pulmão, rim, baço, fígado, timo, adrenais, testículos, próstata e tecido adiposo e o sangue dos animais. O pênis foi processado para análise histológica para identificação das lesões, já os órgãos internos foram pesados. As amostras de sangue foram usadas para determinar valores circulantes de colesterol total, magnésio e albumina. **Resultados:** A análise macroscópica mostrou o desenvolvimento de inflamação na glândula e prepúcio dos animais expostos à CG e ao 4NQO, porém, os que foram tratados pela cirsimarina tiveram diminuição do processo inflamatório. Porém, quanto a análise termográfica, não se observou alterações significativas. Quanto a análise histológica observou-se hiperplasia do epitélio prepucial e um animal desenvolveu neoplasia intraepitelial peniana (PeIN), sendo essas alterações observadas principalmente nos grupos tratados com CG e 4NQO. Os animais tratados com cirsimarina não desenvolveram lesões proliferativas. A cirsimarina também reduziu o peso corporal, a massa adiposa e o colesterol total, aumentou o peso do timo e das adrenais e reduziu o peso do fígado, rim e testículo. **Conclusões:** a administração da CG e do 4NQO resultou numa elevada incidência de inflamação crônica do pênis e prepúcio e numa baixa incidência de lesões proliferativas, apoiando a hipótese de que a inflamação promove a carcinogênese peniana, bem como o efeito anti-inflamatório da Cirsimarina.

Palavras-chave: Câncer de pênis. HPV negativo. Cirsitakaosideo. 4NQO. Carragenina

ABSTRACT

Introduction: Penile cancer is a serious public health problem in North and Northeast Brazil. The current classification of the World Health Organization considers that there are two pathways of penile carcinogenesis, one associated with human papillomavirus (HPV) and another, less well characterized, independent of HPV, which is speculated to be induced by chronic inflammation. Furthermore, there are few treatment options to reduce lesions in this context. The present work aimed to develop an HPV-independent model of penile carcinogenesis, testing the hypothesis that chronic inflammation induces penile cancer and evaluating the potential effect of treatment with the isolated compound Cirsitakaoside (Cirsimarina). **Methods:** Forty male Wistar rats aged 8 weeks were divided into 6 experimental groups, exposed topically on the glans penis to saline (Control group), an inflammatory agent (carrageenan, CG), a mutagen (4-nitroquinoline, 4NQO) and both products. Two groups exposed to GC and 4NQO also received a natural compound with anti-inflammatory properties, cirsimarine (0.5mg/Kg and 1.0mg/Kg). The treatment was carried out for 12 weeks. The macroscopic appearance of the penis and the temperature of the pelvic region were evaluated using photographic and thermographic techniques. The following organs were collected: penis, tongue, heart, lung, kidney, spleen, liver, thymus, adrenals, testes, prostate and adipose tissue and the blood of the animals. The penis was processed for histological analysis to identify the lesions, and the internal organs were weighed. Blood samples were used to determine circulating values of total cholesterol, magnesium and albumin. **Results:** Macroscopic analysis showed the development of inflammation in the glans and prepuce of animals exposed to GC and 4NQO, however, those treated with cirsimarine had a decrease in the inflammatory process. However, regarding the thermographic analysis, no significant changes were observed. As for the histological analysis, hyperplasia of the preputial epithelium was observed and one animal developed penile intraepithelial neoplasia (PeIN), and these alterations were observed mainly in the groups treated with CG and 4NQO. Animals treated with cirsimarine did not develop proliferative lesions. Cirsimarine also reduced body weight, fat mass and total cholesterol, increased thymus and adrenal weights, and reduced liver, kidney and testicular weights. **Conclusions:** The administration of CG and 4NQO resulted in a high incidence of chronic inflammation of the penis and foreskin and a low incidence of proliferative lesions, supporting the hypothesis that inflammation promotes penile carcinogenesis, as well as the anti-inflammatory effect of Cirsimarine.

Keywords: Penile cancer. HPV negative. Cirsitakaoside. 4NQO. Carrageenan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia do pênis adulto murino (A,C) e humano (B,D)	31
Figura 2 – Divisão anatômica do pênis do rato	32
Figura 3 – Fotomicrografia do corte transversal do terço médio do pênis de rato	33
Figura 4 – Estrutura do 4NQO e seus metabólitos	35
Figura 5 – Estrutura química da flavona Cirsimarina (sinônimo Cirsitakaoside).	38
Figura 6 – Evolução de alterações macroscópicas dos pênis durante três momentos do tratamento	48
Figura 7 – Morfologia peniana normal no grupo salina (HE).	49
Figura 8 – Lesões no prepúcio encontradas entre os grupos tratados (HE).	51
Figura 9 – Imagem emitida pela termocâmara da área pélvica dos animais com foco nos pênis	55
Figura 10 – Alterações macroscópicas das línguas do grupo tratado com 4NQO	62
Figura 11 – Alterações macroscópicas das línguas do grupo tratado com 4NQO + CG	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Dosagem de colesterol total de cada grupo tratado com diferentes agentes	53
Gráfico 2 – Dosagem de magnésio de cada grupo tratado com diferentes agentes	54
Gráfico 3 – Dosagem de albumina de cada grupo tratado com diferentes agentes	54
Gráfico 4 – Temperatura da área pélvica dos grupos tratados com os diferentes agentes	55
Gráfico 5 – Peso dos rins de cada grupo tratado com os diferentes agentes	56
Gráfico 6 – Peso dos testículos de cada grupo tratado com os diferentes agentes	57
Gráfico 7 – Peso da próstata de cada grupo tratado com os diferentes agentes	57
Gráfico 8 – Peso das adrenais de cada grupo tratado com os diferentes agentes	57
Gráfico 9 – Peso do fígado de cada grupo tratado com os diferentes agentes	58
Gráfico 10 – Peso do baço de cada grupo tratado com os diferentes agentes	58
Gráfico 11 – Peso do coração de cada grupo tratado com os diferentes agentes	59
Gráfico 12 – Peso do timo de cada grupo tratado com os diferentes agentes	59
Gráfico 13 – Peso dos pulmões de cada grupo tratado com os diferentes agentes	60
Gráfico 14 – Peso do tecido adiposo de cada grupo tratado com os diferentes agentes	60
Gráfico 15 – Peso corporal total de cada grupo tratado com os diferentes agentes	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Subtipos histológicos de carcinomas penianos, sua frequência e resultado.	24
Tabela 2 – Classificação de Grau de Broder's	25
Tabela 3 – Classificação de Jackson para o estadiamento do câncer de pênis.	26
Tabela 4 – Sistema TNM – proposto pela UICC/AJCC para estadiamento do câncer de pênis.	26
Tabela 5 – Definição de estágio do câncer de pênis pela classificação TNM.	27
Tabela 6 – Divisão dos grupos	41
Tabela 7 – Frequência e percentagem de animais com lesões penianas em cada grupo experimental, determinadas em preparações histológicas.	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4NQO - 4 Nitroquinolona 1 Óxido

AJCC - Comitê Americano sobre o Câncer

CCE - carcinoma epidermóide de células escamosas

CG - Carragenina

CIR - Cirsimarina

DNA - ácido desoxirribonucleico

HPV - Papiloma Vírus Humano

IFN- γ - Interferon- gama

IL - Interleucinas

M1 e M2 - macrófagos 1 e 2

MAT - microambiente tumoral

MMP - Matrix metaloproteinases

Nk - Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

PeIN - Neoplasia intraepitelial peniana

RNS -Espécies reativas de nitrogênio

ROS – espécies reativas de oxigênio

SCC - Carcinoma espinocelular comum

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Câncer e Inflamação	18
2.2 Câncer de Pênis	21
2.3 Aspectos histopatológicos e clínicos	23
2.4 O pênis	28
2.4.1 Anatomia do pênis humano	28
2.4.2 Anatomia do pênis do rato	30
2.5 Indução de inflamação com carragenina	34
2.6 Composto 4 nitroquinolona 1 óxido (4NQO)	35
2.7 Fitofármaco	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 Geral	40
3.2 Específicos	40
4 METODOLOGIA	41
4.1 Animais	41
4.2 Preparo das soluções	42
4.3 Avaliação macroscópica das lesões por meio de Fotografias e Termografia	43
4.4 Coleta de sangue e órgãos dos animais	43
4.5 Dosagens Bioquímicas	44
4.6 Pesagem dos órgãos	44
4.7 Análise histológica para coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E)	44
4.8 Fitofármaco	45
4.9 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Observações gerais	47
5.2 Análise macroscópica das lesões penianas	47
5.3 Avaliação histológica de forma qualitativa e quantitativa	49
5.4 Efeito do tratamento no perfil bioquímico e acompanhamento por termografia	53
5.5 Efeito do tratamento no peso dos órgãos e peso corpóreo dos animais	56
5.6 Alterações observadas durante o tratamento com CG e 4NQO	61
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71

ANEXOS

78

Anexo A – Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais

78